

## F. ENT COOPERATION TREA

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 16 July 2001 (16.07.01)	
International application No. PCT/EP00/09245	Applicant's or agent's file reference 0050/050777
International filing date (day/month/year) 21 September 2000 (21.09.00)	Priority date (day/month/year) 01 October 1999 (01.10.99)
Applicant LERCHL, Jens et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 21 April 2001 (21.04.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Charlotte ENGER
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>0050/050777</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 00/09245</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>21/09/2000</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>01/10/1999</b>
Anmelder  <b>BASF AKTIENGESELLSCHAFT</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09245

## A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C12N9/00 C12N15/52 G01N33/53

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBL, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: F14426, 20. Juli 1995 (1995-07-20) MORRIS, P.C., ET AL.: "A. thaliana transcribed sequence; clone YAY969; 3' end; similar to GMP Synthase; Saccharomyces cerevisiae." XP002167639 das ganze Dokument	2
X	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AW041228, 17. September 1999 (1999-09-17) D'ASCENZO M., ET AL.: "EST284092 tomato mixed elicitor, BTI Lycopersicon esculentum cDNA clone" XP002167640 das ganze Dokument	2

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Mai 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

31/05/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Maddox, A



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT 00/09245

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 927 761 A (BASF AG) 7. Juli 1999 (1999-07-07)	2
A	SEQ ID NOS:10 und 11	1,3-12
P,X	<p>-----</p> <p>DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AC011622, 11. Oktober 1999 (1999-10-11) LIN, X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC F24D7 genomic sequence, complete sequence." XP002167641 /product="GMP synthase; 61700-64653"</p> <p>-----</p>	2
P,X	<p>-----</p> <p>DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AW127061, 24. Oktober 1999 (1999-10-24) QUATRANO, R., ET AL.: " ga20f03.y1 Moss EST library PPU Physcomitrella patens cDNA clone PEP_SOURCE_ID:PPU021506 5' similar to TR:066601 066601 GMP SYNTHASE. ;,mRNA sequence." XP002167642 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	2
A	<p>-----</p> <p>US 5 780 254 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-12
A	<p>-----</p> <p>US 5 780 253 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-12
A	<p>-----</p> <p>WO 95 27789 A (SYNTEX INC) 19. Oktober 1995 (1995-10-19) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-12
A	<p>-----</p> <p>WO 98 10074 A (BASF AG ;LERCHL JENS (DE); SONNEWALD UWE (DE); BADUR RALF (DE); SC) 12. März 1998 (1998-03-12) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-12,16



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu derselben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT 00/09245

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0927761 A	07-07-1999	CN 1227870 A	08-09-1999
		CN 1283229 T	07-02-2001
		WO 9933993 A	08-07-1999
		EP 1040193 A	04-10-2000
		JP 11243975 A	14-09-1999
US 5780254 A	14-07-1998	KEINE	
US 5780253 A	14-07-1998	KEINE	
WO 9527789 A	19-10-1995	US 5965350 A	12-10-1999
		AU 2233095 A	30-10-1995
		US 5789216 A	04-08-1998
		US 5998186 A	07-12-1999
WO 9810074 A	12-03-1998	AU 4553097 A	26-03-1998
		BR 9711658 A	24-08-1999
		EP 0927246 A	07-07-1999
		JP 2001500008 T	09-01-2001
WO 9927119 A	03-06-1999	AU 1963999 A	15-06-1999
		BR 9815035 A	03-10-2000
		CN 1280623 T	17-01-2001
		EP 1034284 A	13-09-2000
		ZA 9810771 A	26-05-1999
WO 9619576 A	27-06-1996	US 5519125 A	21-05-1996
		US 5688939 A	18-11-1997
		AU 697094 B	24-09-1998
		AU 4342896 A	10-07-1996
		CA 2207024 A	27-06-1996
		EP 0813599 A	29-12-1997
		FI 972549 A	18-06-1997
		JP 10510714 T	20-10-1998
		US 5882869 A	16-03-1999



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT 00/09245

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C12N9/00 C12N15/52 G01N33/53

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBL, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: F14426, 20. Juli 1995 (1995-07-20) MORRIS, P.C., ET AL.: "A. thaliana transcribed sequence; clone YAY969; 3' end; similar to GMP Synthase; Saccharomyces cerevisiae." XP002167639 das ganze Dokument	2
X	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AW041228, 17. September 1999 (1999-09-17) D'ASCENZO M., ET AL.: "EST284092 tomato mixed elicitor, BTI Lycopersicon esculentum cDNA clone" XP002167640 das ganze Dokument	2



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Mai 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

31/05/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Maddox, A



US

revised version

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN

## PCT

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>0050/050777</b>	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 00/ 09245</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>21/09/2000</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>01/10/1999</b>
Anmelder  <b>BASF AKTIENGESELLSCHAFT</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

#### 1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

#### 4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

#### 5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 00/09245

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C12N9/00 C12N15/52 G01N33/53

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBL, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: F14426, 20. Juli 1995 (1995-07-20) MORRIS, P.C., ET AL.: "A. thaliana transcribed sequence; clone YAY969; 3' end; similar to GMP Synthase; Saccharomyces cerevisiae." XP002167639 das ganze Dokument	2
X	DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: AW041228, 17. September 1999 (1999-09-17) D'ASCENZO M., ET AL.: "EST284092 tomato mixed elicitor, BTI Lycopersicon esculentum cDNA clone" XP002167640 das ganze Dokument	2

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Juni 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28.06.01

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Maddox, A



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 927 761 A (BASF AG) 7. Juli 1999 (1999-07-07)	2
A	SEQ ID NOS:10 und 11	1,3-12
P,X	--- DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: AC011622, 11. Oktober 1999 (1999-10-11) LIN, X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC F24D7 genomic sequence, complete sequence." XP002167641 /product="GMP synthase; 61700-64653"	2
P,X	--- DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: AW127061, 24. Oktober 1999 (1999-10-24) QUATRANO, R., ET AL.: " ga20f03.y1 Moss EST library PPU Physcomitrella patens cDNA clone PEP SOURCE ID:PPU021506 5' similar to TR:066601 066601 GMP SYNTHASE. ;,mRNA sequence." XP002167642 das ganze Dokument	2
A	--- US 5 780 254 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14) das ganze Dokument	1-12
A	--- US 5 780 253 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14) das ganze Dokument	1-12
A	--- WO 95 27789 A (SYNTEX INC) 19. Oktober 1995 (1995-10-19) das ganze Dokument	1-12
A	--- WO 98 10074 A (BASF AG ;LERCHL JENS (DE); SONNEWALD UWE (DE); BADUR RALF (DE); SC) 12. März 1998 (1998-03-12) das ganze Dokument	1-12,16
A	--- WO 99 27119 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ;NOVARTIS AG (CH); GUYER CHARLES DAVI) 3. Juni 1999 (1999-06-03) das ganze Dokument	1-12,16
A	--- WO 96 19576 A (CIBA GEIGY AG) 27. Juni 1996 (1996-06-27) das ganze Dokument -----	1-12



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 927 761 A (BASF AG) 7. Juli 1999 (1999-07-07)	2
A	SEQ ID NOS:10 und 11	1,3-12
P,X	----- DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AC011622, 11. Oktober 1999 (1999-10-11) LIN, X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC F24D7 genomic sequence, complete sequence." XP002167641 /product="GMP synthase; 61700-64653"	2
P,X	----- DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AW127061, 24. Oktober 1999 (1999-10-24) QUATRANO, R., ET AL.: " ga20f03.y1 Moss EST library PPU Physcomitrella patens cDNA clone PEP_SOURCE_ID:PPU021506 5' similar to TR:066601 066601 GMP SYNTHASE. ;,mRNA sequence." XP002167642 das ganze Dokument	2
A	----- US 5 780 254 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14) das ganze Dokument	1-12
A	----- US 5 780 253 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14) das ganze Dokument	1-12
A	----- WO 95 27789 A (SYNTEX INC) 19. Oktober 1995 (1995-10-19) das ganze Dokument	1-12
A	----- WO 98 10074 A (BASF AG ;LERCHL JENS (DE); SONNEWALD UWE (DE); BADUR RALF (DE); SC) 12. März 1998 (1998-03-12) das ganze Dokument	1-12,16



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT 00/09245

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0927761	A	07-07-1999	CN 1227870 A	08-09-1999
			CN 1283229 T	07-02-2001
			WO 9933993 A	08-07-1999
			EP 1040193 A	04-10-2000
			JP 11243975 A	14-09-1999
<hr/>				
US 5780254	A	14-07-1998	NONE	
<hr/>				
US 5780253	A	14-07-1998	NONE	
<hr/>				
WO 9527789	A	19-10-1995	US 5965350 A	12-10-1999
			AU 2233095 A	30-10-1995
			US 5789216 A	04-08-1998
			US 5998186 A	07-12-1999
<hr/>				
WO 9810074	A	12-03-1998	AU 4553097 A	26-03-1998
			BR 9711658 A	24-08-1999
			EP 0927246 A	07-07-1999
			JP 2001500008 T	09-01-2001
<hr/>				



**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. **13-15**   
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich   
 **siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
3. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.



WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 13-15

Die geltenden Patentansprüche 13-15 beziehen sich auf ein Produkt/eine Verbindung/, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich GMP synthetase Inhibitoren. Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT für keinen solchen Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt/Verfahren/die Verbindung über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde keine Recherche durchgeführt

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.



101088027 (0500)

PATENT COOPERATION TREATY

Translation

PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 0050/050777	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/09245	International filing date (day/month/year) 21 September 2000 (21.09.00)	Priority date (day/month/year) 01 October 1999 (01.10.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82		
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

RECEIVED

OCT 07 2002

TECH CENTER 1600/2900

Date of submission of the demand 21 April 2001 (21.04.01)	Date of completion of this report 06 February 2002 (06.02.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



11

1

1

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/09245

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages 1-25, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the claims, Nos. 1,3-16, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. 2, filed with the letter of 21 December 2001 (21.12.2001),  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



11

12

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/09245

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III. 1

Claim 16 is unclear to such an extent that no opinion can be established (PCT Article 6). The "compound" mentioned in the method described is characterized only by functional criteria. It therefore cannot be determined whether the above claim would also encompass known methods for eliminating plant growth.



100

100

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/09245

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	7, 11, 12	YES
	Claims	1-6, 8, 9, 10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

- D1: DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: F14426, 20 July 1995 (1995-07-20) MORRIS, P.C., ET AL.: 'A. thaliana transcribed sequence; clone YAY969; 3' end; similar to GMP Synthase; Saccharomyces cerevisiae.'  
XP002167639
- D6: US-A-5 780 254 (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL), 14 July 1998 (1998-07-14)
- D7: US-A-5 780 253 (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL), 14 July 1998 (1998-07-14)
- D8: WO-A-95/27789 (SYNTEX INC), 19 October 1995 (1995-10-19)
- D9: WO-A-98/10074 (BASF AG; LERCHL JENS (DE); SONNEWALD UWE (DE); BADUR RALF (DE); SC), 12 March 1998 (1998-03-12).

#### 1. Inventive step (PCT Article 33(3))

**1.1** Document D1 was identified as closest prior art with respect to the subject matter of present Claim 1. The present application differs from D1 in that its object is to provide a complete coding sequence of a GMP synthetase



11

1

1

from other plants (*Nicotiana tabacum* and *Physcomitrella patens*).

Document D1 states that its partial sequence from *Arabidopsis thaliana* is similar to a GMP synthetase from *S. cerevisiae*. In the prior art GMP synthetases are referred to as targets for herbicidal action (see, for example, D6: column 3, lines 58 and 59; D7: column 1, lines 51-55; D9: page 1, lines 41-42 and Figure 1). For a person skilled in the art this teaching would be sufficient motivation to determine the full sequence of the clone described in D1 and, with the aid of known methods (e.g. PCR, library screening), use same also to isolate coding sequences for GMP synthetases from other plants. In view of the prior art a person skilled in the art could reasonably have expected to be successful in his attempt.

The expression of such a sequence in prokaryotic or eukaryotic cells (Claim 6) with the aim of synthesizing a plant GMP synthetase likewise represents routine practice and hence cannot substantiate an inventive step.

The use of recombinant GMP synthetases in activity tests for the identification of inhibitors is likewise known in the prior art (e.g. D8: Screening for inhibitors of human GMP-synthetase, Examples 5 and 6).

Claims 1-6, 8 and 9 are ~~therefore~~ not inventive with respect to D1, combined with D6, D7, D8 or D9 (PCT Article 33(3)).

**1.2** Claim 10 discloses a method for identifying substances with herbicidal action which inhibit GMP synthetase activity in plants. However, Claim 10 is not



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100

1

2

restricted to the sequences described in the application or variants thereof, but relates generally to a "DNA sequence coding for an enzyme with GMP synthetase activity". This represents a purely conceptual wording of a screening method for GMP synthetase inhibitors with herbicidal action.

D9 describes the production of transgenic plants which overexpress the enzyme adenylosuccinate synthetase (ADSS). This overexpression results in resistance of the transgenic plants to ADSS inhibitors (page 9, line 45, to page 10, line 6). It is therefore obvious that such transgenic plants can also be used as negative controls in screening methods for identifying new inhibitors. D9 also points out that "some of the enzymes involved in purine biosynthesis [...] constitute potential points of attack for herbicidal substances" (page 1, lines 41 and 42).

The concept of overexpression of purine biosynthesis enzymes for the identification of inhibitors is therefore obvious and can consequently not be considered inventive.

Claim 10 is not inventive with respect to D9 (PCT Article 33(3)).

Moreover, Claim 10 is not sufficiently disclosed and supported by the description (PCT Articles 5 and 6). The present application discloses only methods based on the identified GMP synthetases but does not contain a basis for extension to all "DNA sequences coding for an enzyme with GMP synthetase action".

**1.3** Claims 7, 11 and 12 relate to uses of the GMP synthetases identified in the application for the identification of inhibitors of said enzyme having a



100

1

1

herbicidal action.

Although the provision of the nucleotide or amino acid sequence of a plant GMP synthetase cannot be considered inventive per se (see 1.1), it was not obvious to use this sequence for the identification of GMP inhibitors with herbicidal action.

D6 and D7 disclose a method for identifying herbicides with targeted inhibition of GMP biosynthesis (D6 and D7, EXAMPLE 3). However, they do not clearly demonstrate the effect of the inhibitor mycophenolate on GMP synthase because two enzymes, that is IMP-dehydrogenase and GMP synthase, are potential targets of inhibition. It is therefore not obvious to a person skilled in the art that GMP synthetase is a suitable target for herbicides.

D9 likewise mentions GMP synthetase only in connection with other enzymes of purine biosynthesis without indicating which of these enzymes (apart from ADSS, whose suitability is demonstrated) would be especially suitable as herbicide target.

Claims 7, 11 and 12 are inventive (PCT Article 33(3)).



herbicidal action.

Although the provision of the nucleotide or amino acid sequence of a plant GMP synthetase cannot be considered inventive per se (see 1.1), it was not obvious to use this sequence for the identification of GMP inhibitors with herbicidal action.

D6 and D7 disclose a method for identifying herbicides with targeted inhibition of GMP biosynthesis (D6 and D7, EXAMPLE 3). However, they do not clearly demonstrate the effect of the inhibitor mycophenolate on GMP synthase because two enzymes, that is IMP-dehydrogenase and GMP synthase, are potential targets of inhibition. It is therefore not obvious to a person skilled in the art that GMP synthetase is a suitable target for herbicides.

D9 likewise mentions GMP synthetase only in connection with other enzymes of purine biosynthesis without indicating which of these enzymes (apart from ADSS, whose suitability is demonstrated) would be especially suitable as herbicide target.

Claims 7, 11 and 12 are inventive (PCT Article 33(3)).



11

1

1

1

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
12. April 2001 (12.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/25457 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82, 9/00, 15/52, G01N 33/53

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09245

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
21. September 2000 (21.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 47 490.7 1. Oktober 1999 (01.10.1999) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

**Veröffentlicht:**

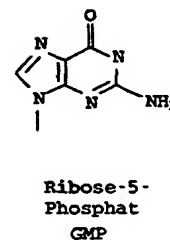
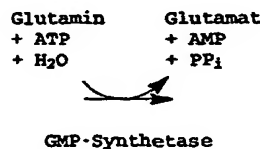
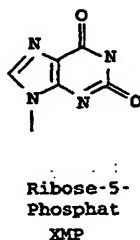
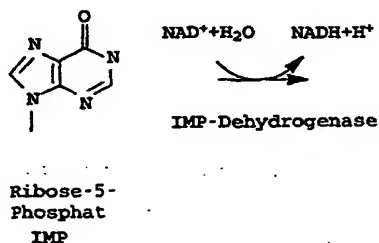
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): LERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, 68526 Ladenburg (DE). EHRHARDT, Thomas [DE/DE]; Maulbronner Hof 49, 67346 Speyer (DE). SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). BOLDT, Ralf [DE/DE]; Stieg 19, 06484 Quedlinburg (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: GMP SYNTHETASE DERIVED FROM PLANTS

(54) Bezeichnung: GMP-SYNTHETASE AUS PFLANZEN



(57) Abstract: The invention relates to a DNA that encodes a polypeptide that has GMP synthetase (EC 6.3.5.2) activity. The invention further relates to the use of said nucleic acid in the production of a test system.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine DNA codierend für ein Polypeptid mit GMP-Synthetase (EC 6.3.5.2) Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Nukleinsäure zur Herstellung eines Testsystems.

WO 01/25457 A2



1

1

## GMP-Synthetase aus Pflanzen

## Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung pflanzlicher GMP-Synthetase (Guanosinmonophosphat-Synthetase) als neues Ziel für herbizide Wirkstoffe. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin DNA-Sequenzen kodierend für ein Polypeptid mit GMP-Synthetase (EC 6.3.5.2)-Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäure kodierend für ein Protein mit GMP-Synthetase-Aktivität pflanzlichen Ursprungs zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung, sowie Inhibitoren pflanzlicher GMP-Synthetase identifiziert unter Verwendung dieses Testsystems. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäure kodierend für pflanzliche GMP-Synthetase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der GMP-Synthetase, sowie zur Herstellung von Pflanzen mit modifiziertem Gehalt an Guanosinnukleotiden. Darüber hinaus betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Beseitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs dadurch gekennzeichnet, daß die zu beseitigenden Pflanzen mit einer Verbindung behandelt werden, die spezifisch an GMP-Synthetase, codiert durch eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser DNA-Sequenz hybridisierenden DNA-Sequenz, bindet und deren Funktion inhibiert.

Pflanzen sind in der Lage, aus Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Salzen ihre Zellkomponenten zu synthetisieren.

30

Dieser Prozeß ist nur möglich, indem biochemische Reaktionen zum Aufbau organischer Substanzen genutzt werden. Pflanzen müssen die Nukleotide als Bestandteile der Nukleinsäuren de novo synthetisieren.

35

Nukleotide müssen als Bestandteile der Nukleinsäuren DNA und RNA insbesondere in schnell wachsenden Geweben der Pflanzen über mehrstufige Stoffwechselwege synthetisiert werden. Nukleotide sind ferner in nahezu alle Stoffwechselwegen eingebunden. Nucleosidtriphosphate, vor allem ATP, treiben viele energieaufwändige Reaktionen der Zelle. Adenosinnukleotide tauchen darüber hinaus auch als Komponente in essentiellen Coenzymen wie Coenzym A sowie Nicotinamid- und Flavin-Coenzymen auf, die an vielen zellulären Umsetzungen beteiligt sind. Guanosinnukleotide geben diversen zellulären Prozessen, wie Proteintranslation, Microtubuli-Assemblierung, vesikulärem Transport, Signaltransduktion und Zellteilung eine Reaktionsrichtung. Ferner stellen Nukleotide die Aus-

gangsmetabolite zur Biosynthese von Methylxanthinen, wie Coffein und Theobromin insbesondere in Pflanzenfamilien der Rubiaceae und Theaceae dar.

- 5 Purinnukleotide werden in Mikroorganismen, Tieren und Pflanzen de novo auf gleiche Weise ausgehend von Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) gebildet. In einer 10-stufigen Reaktionsfolge wird IMP synthetisiert. IMP kann in Folgereaktionen durch Adenylosuccinat-Synthetase und Adenylosuccinat-Lyase zum AMP umgesetzt werden.
- 10 Zur Synthese von GMP wird IMP zunächst durch die IMP-Dehydrogenase zum XMP umgesetzt, welches durch die GMP-Synthetase zum GMP aminiert wird, siehe Abb. 1.

Gene, die für GMP-Synthetase kodieren, wurden aus verschiedenen  
15 Organismen isoliert.

- Die Kompartimentierung des Purinbiosynthesewegs in Pflanzen wurde bisher nur wenig untersucht. Der in den Wurzelknöllchen der Leguminosen in Form von Glutamin und Aspartat fixierte Stickstoff  
20 wird über den de novo Syntheseweg zunächst in Purine überführt. In den Wurzelknöllchen von *Glycine max* und *Vigna unguiculata* L., ist dieser Weg in den Plastiden lokalisiert (Boland and Schubert, Arch. Biochem. Biophys. 220 (1983), 179-187; Shelp et al., Arch. Biochem. Biophys. 224 (1983), 429-441). Neueren Untersuchungen  
25 zufolge sind Enzymaktivitäten des Purinbiosynthesewegs in den Wurzelknöllchen von *Vigna unguiculata* zudem jedoch auch in Mitochondrien zu finden (Atkins et al., Plant Physiology 113 (1997), 127-135; Smith et al., Plant Molecular Biology 36 (1998), 811-820).

- 30 Die Regulation dieses Synthesewegs wurde bislang nur in Mikroorganismen und Tieren untersucht und umfaßt Transkriptionskontrolle, Endproduktinhibierung und allosterische Regulation. Eine Schlüsselstellung im tierischen, als auch pflanzlichen System  
35 wird dem Enzym PRPP-Amidotransferase (PRPP-ATase) des zweiten Reaktionsschritts zugeschrieben, welches durch die Endprodukte IMP, AMP und GMP allosterisch reguliert wird (Reynolds et al., Archives of Biochemistry and Biophysics 229 (1984), 623-631).

- 40 Die GMP-Synthetase spielt auch hinsichtlich einer balancierten Synthese von Guanosinnukleotiden und Adenosinnukleotiden eine Rolle, da ATP ein Substrat der GMP-Synthetase ist.

- Da Pflanzen auf einen funktionierenden Nukleotidstoffwechsel angewiesen sind, bietet sich dieser Stoffwechsel als mögliches Ziel  
45 für neue Herbizide an. Tatsächlich wurden bereits Wirkstoffe beschrieben, die inhibierend auf Enzyme der de novo Purinbiosynt-

## 3

hese wirken. Beispielhaft ist 5'-Phosphohydantocidin zu nennen, welches ein Enzym des pflanzlichen Purin-Stoffwechsels, die Adenylosuccinat-Synthetase (ASS), inhibiert (Siehl et al., Plant Physiol. 110 (1996), 753-758). Ferner existieren Inhibitoren für

5 Enzyme dieses Stoffwechselweges aus Tieren und Mikroorganismen. Folat-Analoga inhibieren diverse Folat-abhängige Reaktionen, unter anderem das Enzym GAR-Transformylase und wirken antiproliferativ, antiinflammatorisch und immunosuppressiv. Mycophenolat (MPA) wirkt als Hemmstoff der IMP-Dehydrogenase antimikrobiell,

10 antiviral und immunosuppressiv (Kitchin et al., Journal of the American Academy of Dermatology 37 (1997), 445-449).

Der Nachweis der Eignung eines Enzyms als Herbizid-Target kann zum Beispiel durch Verringerung der Enzymaktivität mittels der

15 Antisensetechnik in transgenen Pflanzen gezeigt werden. Wird auf diese Weise ein verringertes Wachstum bewirkt, so läßt sich damit auf eine Eignung des in seiner Aktivität reduzierten Enzyms als Wirkort für herbizide Wirkstoffe schließen. Beispielhaft wurde dies für die Acetolactat-Synthase an transgenen Kartoffelpflanzen

20 gezeigt (Höfgen et al., Plant Physiology 107 (1995), 469-477).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es zu belegen, daß GMP-Synthetase in Pflanzen ein geeignetes herbizides Target ist, die Isolierung einer vollständigen pflanzlichen cDNA kodierend für

25 das Enzym GMP-Synthetase und deren funktionelle Expression in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen, sowie die Herstellung eines effizienten und einfachen GMP-Synthetase Testsystems für die Durchführung von Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien.

30 Die Aufgabe wurde gelöst durch Isolierung eines für das pflanzliche Enzym GMP-Synthetase kodierenden Gens, der Herstellung von Antisensekonstrukten der GMP-Synthetase, sowie der funktionellen Expression der GMP-Synthetase in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen.

35 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Isolierung einer Vollängen-cDNA codierend für eine funktionelle Glutamin-hydrolysierende GMP-Synthetase (EC 6.3.5.2.) aus Tabak (*Nicotiana tabacum*).

40 Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine DNA-Sequenz SEQ-ID NO:1 enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen GMP-Synthetase aus Tabak, siehe Beispiel 1.

45

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 enthaltend einen Teil der Kodierregion einer pflanzlichen GMP-Synthetase aus *Physcomitrella patens*, siehe Beispiel 2.

- 5 Weiterer Gegenstand der Erfindung sind DNA-Sequenzen, die von SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No: 3 abgeleitet sind oder mit einer dieser Sequenzen hybridisieren und die für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer GMP-Synthetase besitzt.
- 10 Tabakpflanzen der Linie *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN, die ein Antisensekonstrukt der GMP-Synthetase tragen, wurden näher charakterisiert. Die Pflanzen zeigen in unterschiedlichem Maße eine Wachstumsretardierung. Die transgenen Linien sowie die Nachkommen als 1. und 2. Generation wiesen ein verringertes Wachstum in Erde
- 15 auf. In Pflanzen mit verringertem Wachstum konnte eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte GMP-7M RNA-Menge in der Northern-Hybridisierung detektiert werden. Ferner konnte im Western-blot Experiment eine im Vergleich mit Wildtyppflanzen verringerte Menge der GMP-Synthetase in den transgenen Linien detektiert werden, siehe Beispiel 7. Es läßt sich eine Korellation zwischen Wachstumsretardierung und Reduktion der GMP-Synthetase Protein-
- 20 menge feststellen. Dieser klare Zusammenhang weist GMP-Synthetase erstmals eindeutig als geeignetes Zielprotein für herbizide Wirkstoffe aus.
- 25 Um effiziente Hemmstoffe der pflanzlichen GMP-Synthetase finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette
- 30 cDNA-Sequenz der GMP-Synthetase aus Tabak in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in *E. coli* überexprimiert, siehe Beispiel 4.

- Alternativ kann jedoch die Expressionskassette enthaltend eine
- 35 DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 beispielsweise in anderen Bakterien, in Hefen, Pilzen, Algen, Pflanzenzellen, Insektenzellen oder Säugertierzellen exprimiert werden, siehe Beispiel 5.

- Das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette expri-
- 40 mierte GMP-Synthetase-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die GMP-Synthetase spezifischen Hemmstoffen.

- Dazu kann die pflanzliche GMP-Synthetase beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der GMP-
- 45 Synthetase in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das

## 5

Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen, siehe Beispiel 8.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung, die die GMP-Synthetase Aktivität in Pflanzen hemmen, bestehend aus

15

a) der Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzengewebe, oder Pflanzenzellen, die eine zusätzliche DNA-Sequenz codierend für ein Enzym mit GMP-Synthetase Aktivität enthalten und in der Lage sind eine enzymatisch aktive GMP-Synthetase überzuexprimieren;

20

b) das Aufbringen einer Substanz auf transgene Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile sowie auf nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile;

25

c) das Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz; und

30

d) dem Vergleich des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz;

35

wobei die Unterdrückung des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile ohne jedoch das Wachstum oder die Überlebensfähigkeit der transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile stark zu unterdrücken, belegt, daß die Substanz aus b) herbizide Aktivität zeigt und die GMP-Synthetase Enzymaktivität in Pflanzen inhibiert.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren pflanzlicher GMP-Synthetasen, mit potentiell herbizider Wirkung indem man das Gen einer pflanzlichen

45

## 6

GMP-Synthetase kloniert, in einer geeigneten Expressionskassette - beispielsweise in Insektenzellen - zur Überexpression bringt, die Zellen öffnet und den Zellextrakt direkt bzw. nach Anreicherung oder Isolierung des Enzyms GMP-Synthetasen in einem  
5 Testsystem zur Messung der Enzymaktivität in Gegenwart von niedermolekularen chemischen Verbindungen einsetzt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit herbizider Wirkung, die mit dem oben beschriebenen Testsystem  
10 identifizierbar sind.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Beseitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs, dadurch gekennzeichnet, daß die zu beseitigenden Pflanzen mit einer Verbindung be-  
15 handelt werden, die spezifisch an pflanzliche GMP-Synthetase bindet und deren Funktion inhibiert.

Inhibitoren der GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung können als Defolianten, Desiccants, Krautabtötungsmittel und insbesondere als  
20 Unkrautvernichtungsmittel verwendet werden. Unter Unkraut im weitesten Sinne sind alle Pflanzen zu verstehen, die an Orten aufwachsen, an denen sie unerwünscht sind. Ob die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems gefundenen Wirkstoffe als totale oder selektive Herbizide wirken, hängt unter anderem von der an-  
25 gewandten Menge ab.

Inhibitoren der GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung können beispielsweise gegen folgende Unkräuter verwendet werden:

30 Dikotyle Unkräuter der Gattungen:

Sinapis, Lepidium, Galium, Stellaria, Matricaria, Anthemis, Galinsoga, Chenopodium, Urtica, Senecio, Amaranthus, Portulaca, Xanthium, Convolvulus, Ipomoea, Polygonum, Sesbania, Ambrosia, Cirsium, Carduus, Sonchus, Solanum, Rorippa, Rotala, Lindernia,  
35 Lamium, Veronica, Abutilon, Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaurea, Trifolium, Ranunculus, Taraxacum.

Monokotyle Unkräuter der Gattungen:

Echinochloa, Setaria, Panicum, Digitaria, Phleum, Poa, Festuca,  
40 Eleusine, Brachiaria, Lolium, Bromus, Avena, Cyperus, Sorghum, Agropyron, Cynodon, Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleocharis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphegnoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus, Apera.

## 7

Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, deren Sequenz für eine GMP-Synthetase aus Tabak oder deren funktionelles Äquivalent kodiert. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein.

5

Gegenstand der Erfindung ist auch eine Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 kodierend für einen Teil der pflanzlichen GMP-Synthetase aus *Physcomitrella patens*.

- 10 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, 15 einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das GMP-Synthetase-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von 20 Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.
- 25 Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten GMP-Synthetase-DNA Sequenz und einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and 30 Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

- Gegenstand der Erfindung sind auch funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für eine GMP-Synthetase kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der 40 DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No. 3 von 40 bis 100 % aufweisen.

- Bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für eine GMP-Synthetase kodieren und die 45 bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie

mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No. 3 von 60 bis 100 % aufweisen.

Besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell  
5 äquivalente DNA-Sequenzen, die für eine GMP-Synthetase kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No. 3 von 80 bis 100 % aufweisen.

10 Funktionell äquivalente Sequenzen, die für eine GMP-Synthetase kodieren, sind erfindungsgemäß solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Ge-  
15 brauch einer Pflanze angepaßte, Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich  
20 isolierten für eine GMP-Synthetase kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigt. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorlie-  
25 gende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation dieser Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

30 Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

35 Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel der Herstellung von ausreichenden Mengen des Enzyms GMP-Synthetase eingesetzt werden.

40 Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein aus Tabak gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz SEQ-ID NO: 2 bzw. Derivate oder Teile dieses Proteins mit GMP-Synthetase Aktivität.

Gegenstand der Erfindung sind auch pflanzliche Proteine mit GMP-  
45 Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Tabak GMP-Synthetase von 20 - 100 % Identität.

## 9

Bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Tabak GMP-Synthetase von 50 - 100 % Identität.

- 5 Besonders bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Tabak GMP-Synthetase von 80 - 100 % Identität.

- Gegenstand der Erfindung sind auch pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der *Physcomitrella patens* GMP-Synthetase von 20 - 100 % Identität.

- Bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der *Physcomitrella patens* GMP-Synthetase von 50 - 100 % Identität.

- Besonders bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der *Physcomitrella patens* GMP-Synthetase von 80 - 100 % Identität.

## 20

Weitere Aufgabe der Erfindung war die Überexpression des GMP-Synthetase Gens in Pflanzen zur Herstellung von Pflanzen, die tolerant gegenüber Inhibitoren der GMP-Synthetase sind.

- 25 Durch Überexpression der für eine GMP-Synthetase kodierenden Gensequenz SEQ-ID NO: 1 in einer Pflanze wird eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der GMP-Synthetase erreicht. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

## 30

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten GMP-Synthetase-Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung oder durch einen Keimungstest ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des GMP-

- 35 Synthetase-Gens und deren Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Hemmstoffen der GMP-Synthetase an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

- Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, enthaltend die DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1, die durch zusätzliche Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 tolerant gegenüber Inhibitoren der GMP-Synthetase geworden sind, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt

- 45 sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Sa-

## 10

lat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, sowie Leguminosen.

Eine Veränderung des Nukleotidgehaltes in Pflanzen kann in verschiedenen Fällen von Nutzen sein. Säuglingsnahrungsprodukten auf pflanzlicher Basis werden beispielsweise Nukleotide zugesetzt, um eine der Muttermilch entsprechende Nährstoffzusammensetzung zu erreichen. Weiterhin wäre ein optimierter Nukleotidgehalt im Falle der enteralen Ernährung von Patienten sinnvoll. Ein reduzierter Purin-Nukleotidgehalt in ernährungsrelevanten Pflanzen ist für die diätetische Ernährung Gicht-kranker Patienten relevant. Nukleotide wirken ferner geschmacksbildend und geschmacksverstärkend, so daß sich ein veränderter Nukleotidgehalt auf geschmackliche Eigenschaften von Pflanzen auswirkt.

15

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher Pflanzen, die nach Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No: 3 in der Pflanze einen modifizierten Gehalt an Guanosinnukleotiden aufweisen.

20

Eine Pflanze mit modifiziertem Gehalt an Guanosinnukleotiden wird beispielsweise durch Expression einer zusätzlichen DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder 3 in sense- oder antisense-Orientierung in der Pflanze hergestellt. Modifizierter Gehalt an Guanosinnukleotiden bedeutet, daß sowohl Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Guanosinnukleotiden bei sense-Orientierung als auch Pflanzen mit erniedrigtem Gehalt an Guanosinnukleotiden bei sense-Orientierung (Cosuppression) oder antisense-Orientierung hergestellt werden können.

Erhöhung des Gehaltes an Guanosinnukleotiden bedeutet beispielsweise im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung für Guanosinnukleotide durch funktionelle Überexpression des GMP-Synthetase-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung pflanzlicher GMP-Synthetasen zur Veränderung der Konzentrationen von Methylxanthinen in Pflanzen.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Ent-

## 11

stehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR eingebaut werden, siehe Beispiel 6.

- Als Promotoren der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21(1980), 285-294). Dieser Promotor enthält unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).
- Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen GMP-Synthetase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant.Mol. Biol. (1993) 22, 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., Plant J. (1992) 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP0335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor sind in der Literatur beschrieben und können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Purinen bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J., (1989) 8, 2445-2451).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors kann ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67% des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology (1995) 10, 1090-1094).

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-

## 12

Promotor, den USP- oder LEB4-Promotor), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine GMP-Synthetase kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beispielsweise beschrieben, die gewünschte Eigenschaft der Erhöhung des Gehaltes an Guanosinnukleotiden in der Pflanze durch Überexpression des GMP-Synthetase-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die GMP-Synthetase-Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere erfindungsgemäße geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches GMP-Synthetase-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf GMP-Synthetase-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das GMP-Synthetase-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Zweckmäßigerweise sollten die erfindungsgemäßen Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1. bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

15 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

25 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine GMP-Synthetase kodierenden DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, 40 S.71-119 beschrieben.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus 45 Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme,

## 14

der biolistische Ansatz mit der Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711).

Mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierte *Agrobakterien* können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies sowie Leguminosen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterienlösung* gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Der Biosyntheseort von Pyrimidinen ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des GMP-Synthetase-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Pyrimidin-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen GMP-Synthetase-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobakterien* replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen.

## 15

Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des GMP-Synthetase Gehaltes in der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch  
5 in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

10 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

## Beispiele

15 Gentechnische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen zugrunde liegen:

## Allgemeine Klonierungsverfahren

20 Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden  
25 wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

## Sequenzanalyse rekombinanter DNA

30 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.  
35

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) sowie Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden mit aufbereitetem, pyrogenfreiem  
40 Wasser, im weiteren Text als H<sub>2</sub>O bezeichnet, aus einer Milli-Q Water System Wasseraufbereitungsanlage (Millipore, Eschborn) angesetzt. Restriktionsendonucleasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische Kits wurden von den Firmen AGS (Heidelberg),  
45 Amersham (Braunschweig), Biometra (Göttingen), Roche (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiter-

stadt), Pharmacia (Freiburg) Qiagen (Hilden) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Sie wurden, soweit nicht anders erwähnt, nach Herstellerangaben verwendet.

- 5 Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-1 Blue) wurden von Stratagene bezogen. *E. coli* AT 2465 wurde bei dem coli genetic stock center (Yale University, New Haven) bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder
- 10 pGV3850kan) wurde von Deblaere et al. beschrieben (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777). Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33(1985), 103-119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T
- 15 (Promega), pZerO (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12(1984) 8711-8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230) benutzt werden.

#### Beispiel 1

20

Isolierung einer cDNA des *guaA* Gens, codierend für eine GMP-Synthetase aus Tabak.

- Ein "expressed sequence tag" (EST) aus *Arabidopsis thaliana* (EST
- 25 F14426), der auf einem partiellen Leseraster ein Polypeptid von 68 Aminosäuren mit 60 % Ähnlichkeit zu einer GMP-Synthetase aus *Helicobacter pylori* codiert, wurde 5'-terminal ansequenziert. Von den 5'- und 3'-terminalen Sequenzen wurden die Oligonukleotide
- 30 5'-aag gat cca agc tct aag acc cta tcc-3' und 5'-tta gat ctt tat tcc cat tcg atg g-3' für die Amplifikation durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) eines 1000 bp cDNA-Fragments mit EST F14426 als Matrize in einem DNA-Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer verwendet. Die Reaktionsgemische enthielten 0,1 ng/µl cDNA aus
- 35 Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) und 0.02 U/µl Taq Polymerase (Perkin Elmer).

Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

- |    |                           |                |
|----|---------------------------|----------------|
| 40 | Anlagerungstemperatur:    | 52 °C, 1 min   |
|    | Denaturierungstemperatur: | 92 °C, 1 min   |
|    | Elongationstemperatur:    | 72 °C, 1,5 min |
|    | Anzahl der Zyklen:        | 30             |
- 45 Das Fragment wurde zur Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek aus Kallusgewebe von *Nicotiana tabacum* (Varietät Samsun NN) im Vektor ZAP Express eingesetzt. Dazu wurden  $2,5 \times 10^5$  Lambda Phagen der

- cDNA-Bibliothek auf Agarplatten mit *E. coli* XL1-Blue als Bakterienstamm ausplattiert. Die Phagen-DNA wurde mittels Standardverfahren (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) auf Nitrocellulosefilter (Gelman Sciences) überführt und auf den Filtern fixiert. Als Hybridisierungssonde diente das oben beschriebene PCR-Fragment, das mit Hilfe eines "Multiprime DNA labelling systems" (Amersham Buchler) in Anwesenheit von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert wurde. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte nach Prähybridisierung bei 60 °C in 3 x SSPE, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (w/v), 0,02 % Polyvinylpyrrolidon (w/v), 0,02 % Ficoll 400 (w/v) und 50 mg/ml Kalbsthymus DNA für 12-16 Stunden (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6). Anschließend wurden die Filter 60 Minuten in 2 x SSPE, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (w/v) bei 60 °C gewaschen. Positiv hybridisierende Phagen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und durch Standardtechniken gereinigt und vereinzelt.
- 20 Es konnten 13 hybridisierende Signale identifiziert und gereinigt werden. Nach Restriktionsanalyse wurden die Klone GMP-6 und GMP-7M zur doppelsträngigen Sequenzierung ausgewählt. Die Auswertung der Sequenzdaten zeigte, daß der Klon GMP-7M mit einer Länge von 1973 bp einen vollständigen Leserahmen von 1614 bp enthielt,
- 25 der für ein Protein von 538 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 60,1 kDa kodiert (SEQ-ID No. 1). Vor dem anzunehmenden Start-Codon findet sich im gleichen Leserahmen ein Stop-Codon, was den Schluß zuläßt, daß es sich mit GMP-7M um eine cDNA voller Länge handelt. GMP-7M stellt somit die erste pflanz-
- 30 liche Vollängen-cDNA einer GMP-Synthetase dar. GMP-6 stellt einen partiellen Klon dar, der 5'-seitig um 217 Nukleotide gegenüber GMP-7M verkürzt ist. GMP-7M weist Ähnlichkeiten zu GMP-Synthetasen aus Mikroorganismen und Tieren auf. Neben der auf EST F14426 codierten partiellen Aminosäuresequenz finden sich keine weiteren
- 35 Sequenzen aus Pflanzen mit Homologie zu GMP-Synthetasen in den Datenbanken. Die größte Ähnlichkeit (62 %) besteht zu einer GMP-Synthetase aus *Helicobacter pylori*. Es fällt zudem auf, daß die Ähnlichkeiten zwischen den C-Termini der GMP-Synthetasen größer sind als jene im Bereich der N-Termini. Der N-Terminus der GMP-7M
- 40 Aminosäuresequenz korrespondiert mit den N-termini von GMP-Synthetasen aus anderen Organismen, wie *E. coli* und *Synechocystis* sp. (Tabelle 1). GMP-7M weist keine ausgeprägten Signalsequenzen auf (ermittelt durch Programm PSORT, Nakai, K., Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University, Japan) was auf
- 45 eine cytosolische Lokalisation des Proteins hinweisen könnte.

Tabelle 1

Sequenzgegenüberstellung von GMP-Synthetasen aus *Nicotiana tabacum* (guaA\_N.t = GMP-7M), *Arabidopsis thaliana* (guaA\_est\_A.t, Genbank Nr. F14426), *E.coli* (guaA\_e.c, Genbank Nr. 146276), *Synechocystis* sp. (guaA\_syn, Genbank Nr. 1001583), *Helicobacter pylori* (guaA\_h.p, Genbank Nr. 3122166), *Homo sapiens* (guaA\_human, Genbank Nr. 1708072).

10		1			50	
	guaA_N.t	-----	-----MEPQ	TQAKKSNLVL	ILDYGSQYTH	LITRRIRSLS
	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	-----
	guaA_e.c	-----	-----m	tenihkhril	ildfgsqytq	lvarrvrelg
	guaA_syn	mttqipvppv	vsdgalpdri	sdrllkgqiiv	ildfgsqyse	liarrirete
	guaA_h.p	-----	-----	-----mil	vldfgsqytq	liarrlrerg
15	guaA_human	~malcngdsk	lenaggdlkd	ghhhyegavv	ildagaqygk	vidrrvrelf
		51				100
	guaA_N.t	IFSLTINGTS	SLDSIKELDP	RVIILSGGPH	SVHADGAPCF	PPGFIEYVES
	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	-----
	guaA_e.c	vycelwawdv	teaqirdfnp	sgiiilsggpe	stteenspra	pq...yvfe
20	guaA_syn	vysevlsyrt	taqqlreikp	kgiilsggpn	svydggapec	dp...eifq
	guaA_h.p	iyteivpffe	sieniqkkap	kglilsggpa	svyakdaykp	sg...kifd
	guaA_human	vqseifplet	pafaikeggf	raiiisggpn	svyaedapwf	dpa....ift
		101				150
	guaA_N.t	RGIHVLGICY	GLQLIVQKLG	GVVKIGEKHE	YGRMEIEVGK	NVV....GGL
25	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	-----
	guaA_e.c	agvpvfgvcy	gmqtmamqlg	ghveasnere	fgyaqvevvn	dsalvrgied
	guaA_syn	lgvpvlgvcy	gmqlmvkqlg	grverakrge	ygkaslhidd	ptdlltnven
	guaA_h.p	lnvpilgicy	gmqylvdfff	gvvvganeqe	fgkavleitq	nsvifegv..
	guaA_human	igkpvlgicy	gmqmmnkfvf	gtvhkksvre	dgvfnisvvn	tcslfrglqk
		151				200
30	guaA_N.t	FGNTEIGDKQ	VVWMSHGDEA	VKLPEGFEVV	ARSSQGAVAA	IENRERRFYG
	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	-----
	guaA_e.c	altadgkpll	dvwmshgdkv	taipsdfitv	astescpfai	maneekrfyg
	guaA_syn	dst.....	.mwmsgdsc	vdltptgfeil	ahtdntpcaa	iadhqkalfg
	guaA_h.p	.....kiks	lvwmshmdkv	ielpkgfttl	akspnsphca	iengk..ifg
	guaA_human	.....ee	vvl1thgds	dkvadgfkvv	arsgni.vag	ianeskklyg
35		201				250
	guaA_N.t	LQYHPEVTHS	TEGMRTLRFH	LFDVCGVTAG	WKMEDVLEEE	IKVIKGMVGP
	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	-----
	guaA_e.c	vqfhpevtth	rqqmrmleerf	vrddicqceal	wtpakiidda	varireqvg.
	guaA_syn	vqfhpevvhs	vggialirnf	vyhichcept	wttaafiees	irevrsqvg.
	guaA_h.p	lqfhpevvqs	eeggkilenf	allvcgcekt	wgmqhfaqre	iarlkekia.
40	guaA_human	aqfhpevglt	engkvilknf	lydiagcsgr	ftvqnrelec	ireikervgt
		251				300
	guaA_N.t	EDHVICALSG	GVDSTVAAKL	VHKAIG.DRL	HCVFVDNGLL	RYKERERVME
	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	-----
	guaA_e.c	ddkvilglsg	gvdssvtaml	lhraig.knl	tcvfvdngll	rlneaeqvld
45	guaA_syn	drvvllalsg	gvdssstlaf	lhraig.dnl	tcmfidqgfm	rkgeperlve
	guaA_h.p	nakvlcavsg	gvdstvvatl	lhraik.dnl	iavfvdhgl	rknekervqa
	guaA_human	s.kvlvllsg	gvdstvctal	lnralnqeqv	iavhidngfm	rkresqsvee

## 19

		301				350
	guaA_N.t	LFEK.....	.....	...RLHLPVT	CVDATEEFLS	KLKGVTEPEM
	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_e.c	mfgd.....	.....	...hfglniv	hvpae drfls	alagendpea
	guaA_syn	lf dh.....	.....	...qfhipvq	yvnardrflk	qlegvtdpee
5	guaA_h.p	mfkd.....	.....	....lkipln	tidakevfls	klkgvsepel
	guaA_human	alkklgiqv	k vinaahsfyn	gtttlpisde	drtprkrisk	tlmmttspee
		351				400
	guaA_N.t	KRKIIGKEFI	NIFDLFAHDV	EEKVGKKPSY	LVQGTLYPDV	IESC...PPP
	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_e.c	krkiigrvfv	evfd..eeal	k...ledvkw	laqgtiypdv	iesaa s....
10	guaA_syn	krklighefi	qvfe..eesn	r...lgpf dy	laqgtlypdv	iesadsnvd p
	guaA_h.p	krkiigetfi	evfe..keak	khhlkgkief	laqgtlypdv	iesvsv....
	guaA_human	krkiigdtfv	ki..anevig	emnlkpeevf	laqgtlrpd l	iesasl....
		401				450
	guaA_N.t	GSGRTHSHTI	KSHHNVGGLP	KDMKL..KLI	EPLKLLFKDE	VRELGKILDI
15	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_e.c	atgk..ahvi	kshhnvgg lp	kemkm..glv	eplkelfkde	vrkiglelgl
	guaA_syn	ktgervavki	kshhnvgg lp	knlrf..klv	eplrklfkde	vrklgrsigl
	guaA_h.p	...kgpskvi	kthhnvgg lp	ewmdf..kli	eplrelfkde	vrllgkelgv
	guaA_human	.vasgkaeli	kthhndteli	rkltreegkvi	eplkdfhkde	vrlgrelgl
		451				500
20	guaA_N.t	SEDFLKRHPF	PGPGLAVRIP	GDVTAGNSLD	ILRQVDEIFI	QSIRDAKIYD
	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_e.c	pydmlyrhp f	pgpglgvr vl	gevk k.eycd	llrradaifi	eelrkadlyd
	guaA_syn	peeivrrhp f	pgpglairii	gevts.erln	ilrdadfivr	deiskrgiyh
	guaA_h.p	sqdfmlrhp f	pgpglavril	geise.skik	rlqeadfifi	eelkkanlyd
25	guaA_human	peelv srhp f	pgpglairvi	c.aeepyick	dfpetnnilk	ivadfsasvk
		501				550
	guaA_N.t	EIWQAFVFL	PVKTVGVQGD	QRTSHHAVAL	RA.VTSQDGM	TADWYFDFK
	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_e.c	kvsqaftvfl	pvrsvgvmgd	grkydwvvs l	ra.vetidfm	tahwahlp yd
	guaA_syn	dywqafavll	pirsvgvmgd	krtyahpvvl	rf.it sedgm	tadwarvp yd
30	guaA_h.p	kvwqafcvll	nvnsvgvmgd	nrtynaicl	ra.vnasdgm	tasfsflehs
	guaA_human	kphtllqrvk	actteedqek	lmqitslhsl	naflpiktv	gvqgdcrsys
		551				600
	guaA_N.t	FLDDVSRKIC	NSVRGVNRVL	LDITSKPPST	IEWE~~~~~	~~~~~
	guaA_est_A.t	flddvsrkic	nsvqgvnr vv	lditskppst	iewe~~~~~	~~~~~
	guaA_e.c	flgrvsnr ii	nevngisrvv	ydisgkppat	iewe~~~~~	~~~~~
35	guaA_syn	ileaisnriv	nevgvnr vv	yditskppgt	iewe~~~~~	~~~~~
	guaA_h.p	flekvsnr it	nevsginrvv	yditskppgt	iewe~~~~~	~~~~~
	guaA_human	yvcgisskde	pdweslifla	rliprmchnv	nrvvyifgpp	vkep ptdvtp
		601				650
	guaA_N.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
40	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_e.c	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_syn	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_h.p	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_human	tflttgvlst	lrqadfeahn	ilresgyagk	isqmpvilt p	lhfd rdp lqk

## 20

		651				700
	guaA_N.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_e.c	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_syn	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
5	guaA_h.p	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_human	qpscqrsvvi	rtfitsdfmt	gipatpgnei	pvevvlkmvt	eikkipgisir
		701	716			
	guaA_N.t	~~~~~	~~~~~			
	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~			
10	guaA_e.c	~~~~~	~~~~~			
	guaA_syn	~~~~~	~~~~~			
	guaA_h.p	~~~~~	~~~~~			
	guaA_human	imydltskpp	gttewe			

## Beispiel 2

- 15 Isolierung einer cDNA des guaA Gens, codierend für eine GMP-Synthetase aus dem Moos *Physcomitrella patens*

Aus mRNA verschieden alter Protonemata von *Physcomitrella patens* wurde doppelsträngige cDNA erzeugt und zur Herstellung einer  
 20 cDNA-Bank im Vektor pBluescript SKII verwendet ( lambda ZAP II RI Library construction Kit, Stratagene). Einzelne Klone dieser Bank wurden ansequenziert. Die Sequenz des Klons 093-d11 wies deutliche Homologie zur GMP-Synthetase aus *Aquifex aeolicus* auf. Die  
 25 vollständige Sequenz von 093-d11 wurde bestimmt, siehe SEQ-ID No. 3. 093\_d11 weist eine Länge von 1232 Nukleotiden auf und codiert auf einem durchgehenden Leseraster für 382 Aminosäuren. Aus dem Vergleich mit GMP-7M geht hervor, daß es sich bei 093\_d11 um eine partielle cDNA handelt. Die Homologie zu GMP-7M beträgt 66,7 %  
 30 auf Nucleotidebene bzw. 74,6 % auf Aminosäureebene.

## Beispiel 3

Funktionsnachweis für GMP-7M durch Komplementation von *E. coli*

- 35 Die GMP-7M cDNA wurde als Matrize für eine PCR mit den Oligonucleotiden 5'-CCTAGCCATGGAACCTCAAAC-3' und 5'-TATAGGATCCTACTTTG-GTCACC-3' eingesetzt. Die Reaktionsgemische enthielten ca. 0,1 ng GMP-7M DNA, 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide, 200 µM Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei  
 40 25 °C, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) und 0.02 U/µl Pfu-Polymerase (Stratagene).

Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

## 21

Anlagerungstemperatur: 50 °C, 30 sec  
 Denaturierungstemperatur: 92 °C, 30 sec  
 Elongationstemperatur: 72 °C, 3 min  
 Anzahl der Zyklen: 25

5

- Das erhaltene Fragment von ca. 1670 bp wurde über die durch die Oligonukleotide eingefügten NcoI- und BamHI-Schnittstellen in den Vektor pTrc99A (Pharmacia) ligiert. Das erhaltene Konstrukt GMP-7Trc wurde in den E.coli Stamm AT2465 (genetische Marker: thi-1, guaA21, relA1,  $\lambda$ , spoT1) transformiert und auf M9-Minimalmedien (Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) mit und ohne 100  $\mu$ g/ml Guanosin plattiert. Die Minimalmedien enthielten 0,4 % Glucose, 0,2% Casaminoacids, 100  $\mu$ g/ml Thiamin, 100  $\mu$ g/ml Inosin, 100  $\mu$ g/ml Biotin, 100  $\mu$ g/ml Histidin, 100  $\mu$ g/ml Arginin, 100  $\mu$ g/ml 2'-Deoxyuridin, 100  $\mu$ M IPTG und 25  $\mu$ g/ml Ampicillin. Im Parallelexperiment wurde der Klonierungsvektor pTrc99A in AT2465 transformiert. Es zeigte sich, daß nur die transformierten Bakterien zu einem Wachstum auf Minimalmedien ohne Guanosin fähig waren, die eine GMP-7M cDNA aus Tabak im Expressionsvektor pTrc 99 A enthielten (siehe Tab. 2), was stark darauf hinweist, daß die GMP-7M cDNA für eine aktive GMP-Synthetase codiert. Das durch GMP-7M codierte Enzym stellt damit die erste aus Pflanzen isolierte funktionelle GMP-Synthetase dar.

25

Tabelle 2

Wachstum von E. coli AT2465 transformiert mit verschiedenen Plasmiden nach 2 Tagen bei 37°C

30

	pTrc 99A + GMP-7M	pTrc99A
Minimalmedium ohne Guanosin	+	-
Minimalmedium mit Guanosin (100 $\mu$ g/ml)	+	+

35

## Beispiel 4

- Überexpression der GMP-Synthetase aus Tabak in E.coli und Erzeugung von Antikörpern

Zur Überexpression in E.coli wurden durch PCR mit GMP-7M als Matrize und den Oligonukleotiden GMPA: 5'-GCAATGGATCCTCAAACA-CAGGCG-3' und GMPB: 5'-AAAAGGATCCTACTTTGGTCACC-3' BamHI-Schnittstellen eingeführt, über welche das Fragment in den Vector pET15b (Novagen) kloniert werden konnte. Auf diese Weise wurde ein

45

## 22

GMP-7M-Leseraster mit Hexahistidin-Anker am N-Terminus erzeugt. Nach Kontrolle der korrekten Orientierung durch Restriktionsverdau und Ausschluß von Polymerasefehlern durch Sequenzierung, wurde das erhaltene Konstrukt GMP-7E in *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene) transformiert. IPTG-induzierte Tageskulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und die Zellpellets nach Herstellerangaben zur Nickel-Affinitätschromatographie aufgeschlossen und weiterbehandelt ("Qia-Express-Kit", Qiagen). Auf diese Weise konnte die GMP-Synthetase auf mehr als 95 % Reinheit aufgereinigt werden. Das Protein wurde nach üblichen Protokollen zur Erzeugung von Antiseren in Kaninchen verwendet (im Auftrag durchgeführt durch die Firma Eurogentec, Herstal, Belgien).

## Beispiel 5

15

Expression der GMP-Synthetase aus Tabak in Baculovirus-infizierten Insektenzellen

Um genügend aktive GMP-Synthetase für die Massentestung von Chemikalien zu erhalten, wurde aus GMP-7E mit BamHI ein 1,65 kb Fragment excisiert und in den Transfervektor pFastBachTa (GibcoBRL) kloniert. Das erhaltene Konstrukt GMP-7I wurde nach Herstellerangaben (GibcoBRL) zur Erzeugung von rekombinantem Baculovirus verwendet. Dieses Virus wurde nach Herstellerangaben (GibcoBRL) zur Infektion von Sf21 Insektenzellen genutzt, um aktive GMP-Synthetase zu erzeugen, deren Aktivität nach Aufschluß der Zellen in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM PMSF und Entsalzung des Extraktes über eine Sephadex G-25-Säule (Pharmacia, Schweden) gemessen werden konnte.

30

## Beispiel 6

Erzeugung pflanzlicher Expressionskassetten

Mit dem Ziel die GMP-Synthetase-Aktivität in transgenen Tabakpflanzen zu reduzieren, wurde die Antisense- und die Cosuppressionstechnik angewendet. Dazu wurden Plasmid-Konstrukte im Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science (1990) 66, 221-230) erzeugt. Ein mit BamHI und BglIII aus GMP-7M erhaltenes Fragment von 1599 bp wurde in den mit BamHI geschnittenen Vector pBinAR ligiert. Das 1599 bp Fragment codiert den 5'-terminalen Teil der GMP-Synthetase cDNA. Nach Transformation in *E. coli* XL1-blue erhaltene Klone wurden durch Kontrollschnitt mit HindIII auf die Orientierung der 1599-Kassette untersucht. Auf diese Weise wurden die Plasmide pGMP7AS (antisense-Konstrukt) und pGMP7EX (sense-Konstrukt) identifiziert, siehe Abbildung 2.

## Beispiel 7

## Erzeugung und Analyse transgener Pflanzen

- 5 Die Plasmide pGMP7AS und pGMP7EX - siehe Abbildung 2 - wurden in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 transformiert (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 13(1984), 4777-4788). Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten *Agrobakterienkolonie* in Murashige-Skoog Medium (Phy-  
10 siol. Plant. 15(1962), 473) mit 2 % Saccharose (2MS-Medium) benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 *Agrobakterienverdünnung* für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkel-  
15 heit bei 25 °C auf 2MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphthylelessigsäure und 1,6 g/l  
20 Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Regenerierte Sprosse werden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer im 16 Stunden  
25 hell/8 Stunden dunkel-Rhythmus bei 60 % Luftfeuchte auf Fremdgenexpression bzw. veränderte Metabolitgehalte und phänotypische Wachstumsmerkmale untersucht. Veränderte Nukleotidgehalte können z.B. nach der Methode von Stitt et al. (FEBS Letters, 145 (1982), 217-222) bestimmt werden.
- 30 Die transgenen GMP-Synthase Antisense-Pflanzen und ihre Folgegeneration waren durch ein vermindertes Wachstum im Vergleich zu WT-Kontrollpflanzen und durch ein Ausbleichen der Sink-Blätter gekennzeichnet. Diese phänotypischen Veränderungen traten in  
35 einem frühen Wachstumsstadium auf (s. Abb.3). In Pflanzen mit verringertem Wachstum konnte eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte GMP-7M RNA-Menge in der Northern-Hybridisierung detektiert werden. Dazu wurden je 40 µg Gesamt-RNA aus Sink-Blättern eingesetzt. Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben wurde wie bei Logemann  
40 et al. (Anal. Biochem. 163 (1987), 21) isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 40 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylon Membranen (Hybond, Amersham) überführt. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino beschrieben durchgeführt (Anal. Biochem. 152(1986), 304).
- 45 Es wurde eine spezifische c-DNA-Sonde des Antisense-Stranges erzeugt. Hierzu wurde das Plasmid GMP-7M mit BamHI und BglIII gespalten und ein 1600 bp umfassendes Fragment isoliert. Für die

Markierungsreaktion wurde das Oligonukleotid; 5'-GAT ACG TCG TCA AGG AAC TTG-3' eingesetzt. Die Sonde wurde nach Standardmethoden hybridisiert, siehe Hybond-Benutzerhinweise, Amersham. Hybridisierungssignale wurden durch Autoradiographie mithilfe von X-OMAT  
5 AR Filmen der Fa. Kodak sichtbar gemacht. Es zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen der Ausprägung des Wachstumsphänotyps und einer Verringerung des GMP-7M RNA-Menge (Abb. 3).

Ferner konnte im Western-blot Experiment eine im Vergleich mit  
10 Wildtyppflanzen verringerte Menge der GMP-Synthetase in den transgenen Linien detektiert werden. Dazu wurden Gesamtproteinextrakte aus Sink-Blättern hergestellt, nach Standardmethoden in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Die Detektion erfolgte mit  
15 einem IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat und dem BCIP/NBT-System (Sigma).

Desweiteren konnte durch den in Beispiel 8 beschriebenen in vitro Assay eine verringerte GMP-Synthetase-Aktivität in transgenen  
20 Linien mit verringertem Wachstum festgestellt werden.

Der korrelative Zusammenhang zwischen Expressionsniveau sowie der Aktivität der GMP-Synthetase und dem Wachstumsphänotyp läßt auf die Eignung der GMP-Synthetase als Target für Herbizide schließen.  
25

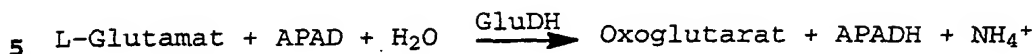
#### Beispiel 8

##### Testsysteme zur Messung der GMP-Synthetase-Aktivität

30 Zur Messung der pflanzlichen GMP-Synthetase-Aktivität können die nach Spector (Methods in Enzymology LI, 1978, 219-224) für tierische Enzyme entwickelten Systeme verwendet werden. Im ersten System wird die AMP-Bildung durch Kopplung der Reaktion mit AMP-Kinase, Pyruvat Kinase, Lactat-Dehydrogenase und Messung bei 340 nm  
35 ermöglicht. Das zweite System basiert auf dem direkten Nachweis des GMP (Guanosinmonophosphat) durch Einsatz des radioaktiv markierten Substrats XMP (Xanthinmonophosphat) und Auftrennung in der Dünnschichtchromatographie.

40 Alternativ kann die GMP-Synthetase-Aktivität auch über ein neues System, nämlich den gekoppelten Nachweis des entstehenden Glutamins gemessen werden. Dieses System bietet den Vorteil einer geringeren Anzahl gekoppelter Reaktionsschritte und liefert größere  
45 Signalstärken.

## 25



(GMP-S = GMP-Synthetase, GluDH = Glutamat-Dehydrogenase, APAD = 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid)

- 10 Dazu wurde der Reaktionsansatz (s.u.) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch 5-minütige Inkubation bei 95°C gestoppt. Der Nachweis des gebildeten Glutamats erfolgte im Nachweisansatz (s.u.) durch photometrische Messung der APADH-Zunahme bei 363 nm.

15

Reaktionsansatz:

	100 µL	750 mM	Tris/HCl-Puffer pH 7,8
	100 µL	100 mM	MgCl <sub>2</sub>
20	100 µL	80 mM	KCl
	100 µL	20 mM	XMP
	100 µL	200 mM	L-Glutamin
	400 µL		H <sub>2</sub> O
	<u>100 µL</u>		Proteinextrakt
25	1000 µL		

Nachweisansatz:

	375 µL	100 mM	Tris-HCl-Puffer pH 8.0
30	75 µL	500 mM	KCl
	125 µL		H <sub>2</sub> O
	75 µL	3 mM	APAD
	<u>100 µL</u>		des Reaktionsansatzes
	750 µL		

35

Beispiel 9

Suche nach Inhibitoren der GMP-Synthetase Aktivität

- 40 Zur Suche nach Inhibitoren der GMP-Synthetase Aktivität kann der in Beispiel 8 beschriebene *in vitro* Assay mit Hochdurchsatzmethoden verwendet werden. Die GMP-Synthetase Aktivität kann dazu aus Pflanzengewebe präpariert werden. Bevorzugt kann eine pflanzliche GMP-Synthetase in *E. coli*, Insektenzellen oder einem anderen
- 45 geeigneten Expressionssystem exprimiert und anschließend angereichert oder isoliert werden. Auf diese Weise konnten bekannte Inhibitoren, wie 6-thio-XMP identifiziert werden.

## Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen  
5 GMP-Synthetase, dadurch gekennzeichnet, daß diese DNA-Sequenz die Nukleotidabfolge SEQ-ID No: 1 oder SEQ-ID No: 3 aufweist.
2. DNA-Sequenzen, die mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder  
SEQ-ID No: 3 gemäß Anspruch 1 oder Teilen davon oder Deriva-  
10 ten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind, hybridisieren und für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer GMP-Synthetase besitzt.
- 15 3. Protein mit GMP-Synthetase-Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ-ID NO: 2 oder 4 darstellt.
4. Protein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es als  
20 Aminosäuresequenz die Teilsequenz 50 - 300 aus SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID No: 4 enthält.
5. Protein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es als  
Aminosäuresequenz die in SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID No: 4 dar-  
25 gestellte Sequenz enthält.
6. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 zur Einführung in pro- oder eukaryontische Zellen, wobei diese Sequenz gegebenenfalls mit Steuerelementen, die die Transkription und Translation in den Zellen gewährleisten, verknüpft  
30 ist und zur Expression einer translatierbaren mRNA, die die Synthese einer pflanzlichen GMP-Synthetase bewirkt, führt.
7. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von  
35 Inhibitoren der pflanzlichen GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung.
8. Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die die Aktivität der  
40 pflanzlichen GMP-Synthetase inhibieren, dadurch gekennzeichnet, daß in einem ersten Schritt unter Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 GMP-Synthetase hergestellt wird und in einem zweiten Schritt die Aktivität der pflanzlichen GMP-Synthetase in Anwesenheit einer Testsubstanz gemessen  
45 wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Messung der pflanzlichen GMP-Synthetase in einem High-Throughput-Screening (HTS) ausgeführt wird.
- 5 10. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung, die die GMP-Synthetase Aktivität in Pflanzen hemmen, bestehend aus
- 10 a) der Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzengeweben, oder Pflanzenzellen, die eine zusätzliche DNA-Sequenz codierend für ein Enzym mit GMP-Synthetase Aktivität enthalten und in der Lage sind eine enzymatisch aktive GMP-Synthetase überzuexprimieren;
- 15 b) das Aufbringen einer Substanz auf transgene Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile sowie auf nicht-transformierte Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile;
- 20 c) das Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz; und
- 25 d) dem Vergleich des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz;
- 30 wobei die Unterdrückung des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile ohne jedoch das Wachstum oder die Überlebensfähigkeit der transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile stark zu unter-
- 35 drücken, belegt, daß die Substanz aus b) herbizide Aktivität zeigt und die Enzymaktivität in Pflanzen inhibiert.
11. Testsystem basierend auf der Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 nach Anspruch 1 oder 2 zur
- 40 Identifizierung von Inhibitoren der pflanzlichen GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung.
12. Testsystem gemäß Anspruch 11 zur Identifizierung von Inhibitoren pflanzlicher GMP-Synthetase, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym mit einem zu untersuchenden Testsubstrat
- 45 inkubiert und nach einer geeigneten Reaktionszeit die enzyma-

tische Aktivität des Enzyms im Vergleich zur Aktivität des nicht gehemmten Enzyms ermittelt wird.

13. Inhibitoren pflanzlicher GMP-Synthetase.
- 5
14. Inhibitoren pflanzlicher GMP-Synthetase, identifiziert unter Verwendung eines Testsystems nach Anspruch 11 oder 12.
15. Inhibitoren nach einem der Ansprüche 13 oder 14 zur
- 10 Verwendung als Herbizid.
16. Verfahren zur Beseitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs, dadurch gekennzeichnet, daß die zu beseitigenden Pflanzen mit einer Verbindung behandelt werden, die spezifisch an GMP-
- 15 Synthetase, codiert durch eine DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2, bindet und deren Funktion inhibiert.

20

25

30

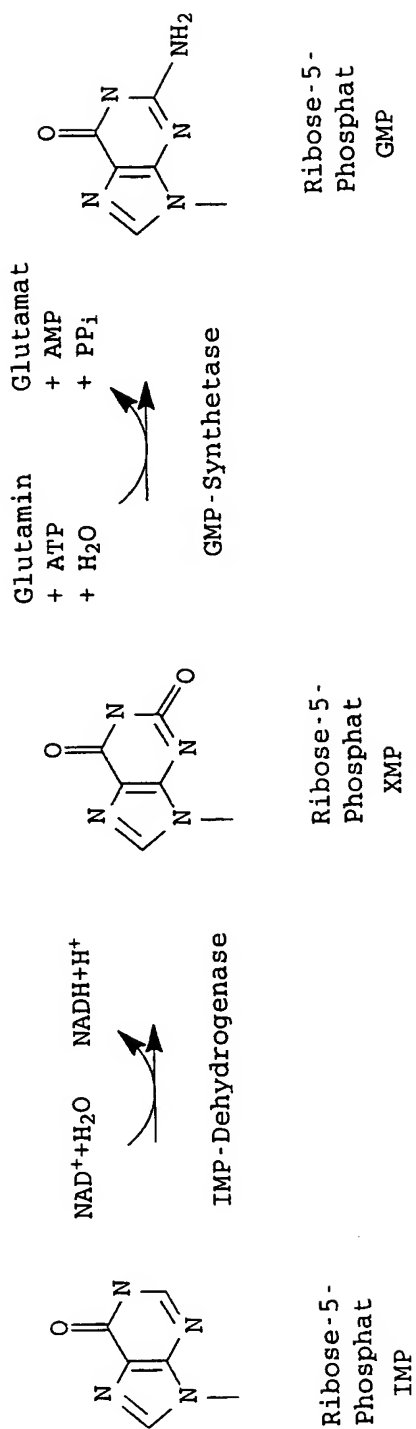
35

40

45

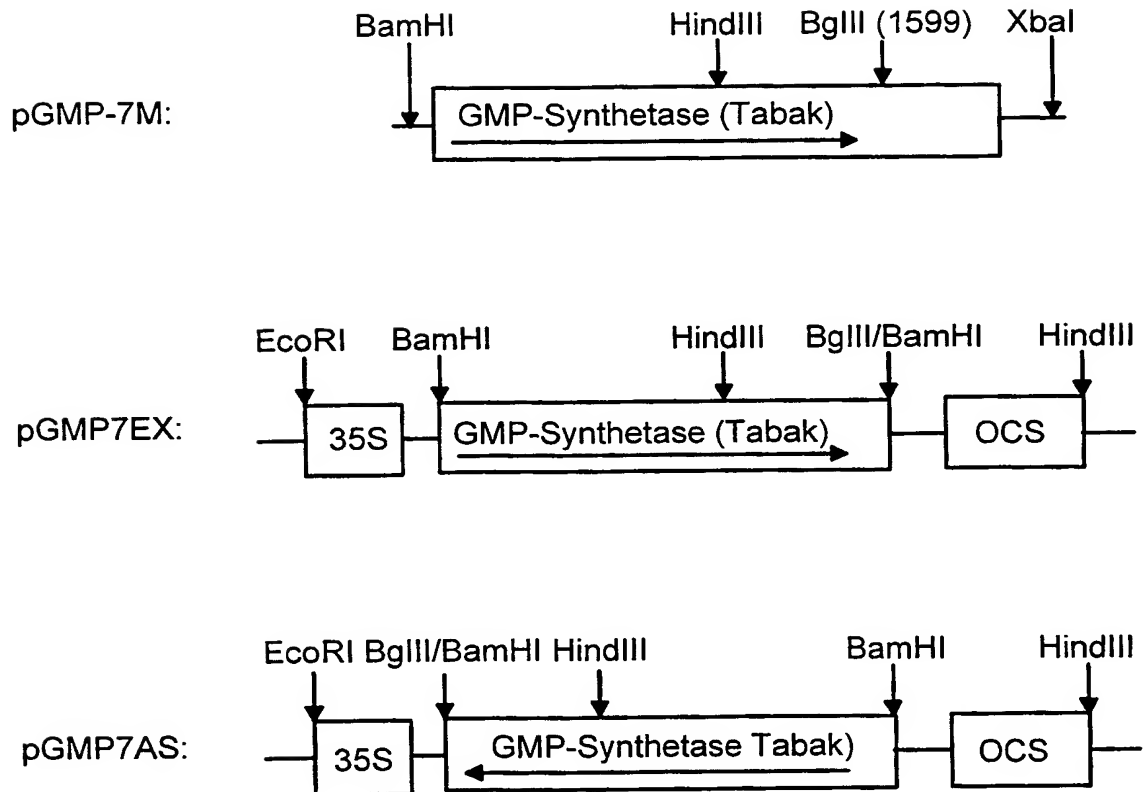
1/4

FIG. 1





## FIG.2





3/4

Abb. 3:

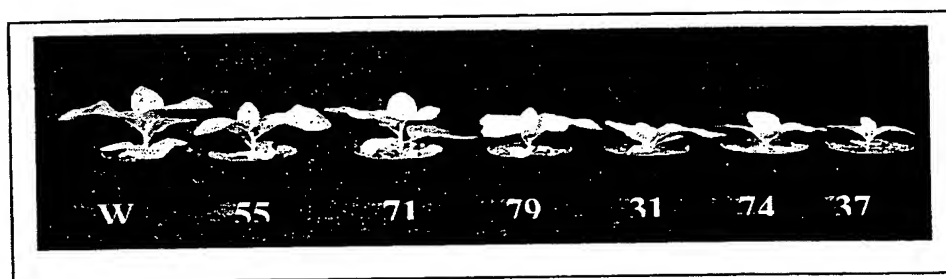
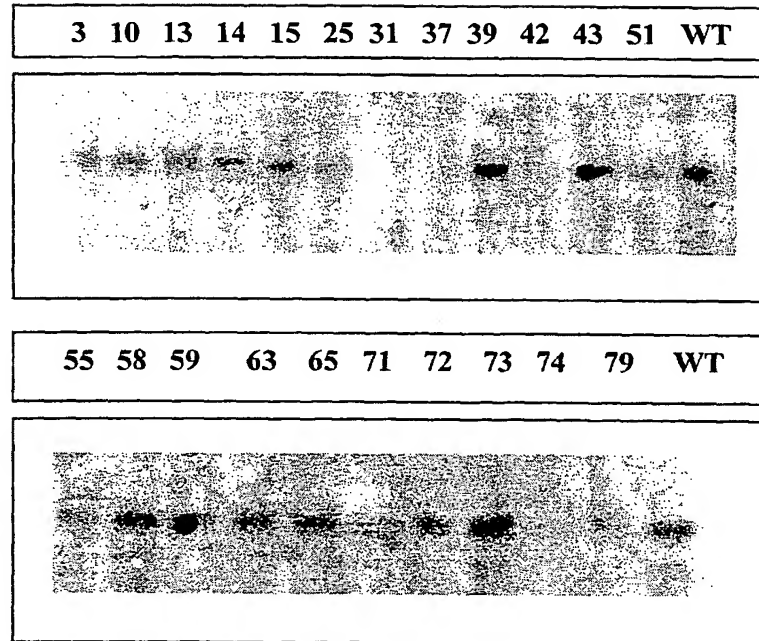




Abb. 4:





## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Aktiengesellschaft

&lt;120&gt; GMP-Synthetase aus Pflanzen

&lt;130&gt; DE 19947490.7

&lt;140&gt; 0050-50777

&lt;141&gt; 1999-10-01

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Vers. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1973

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Nicotiana tabacum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (65)..(1678)

&lt;400&gt; 1

gaattcggca cgagatttct ctctatcttt ctctctccca cccaccaccc accctcccct 60

agca atg gaa cct caa aca cag gcg aag aaa tca aac ctc gta cta atc 109

Met Glu Pro Gln Thr Gln Ala Lys Lys Ser Asn Leu Val Leu Ile

1

5

10

15

cta gac tac ggt tct cag tac act cac cta atc acc cgc cga atc cga 157

Leu Asp Tyr Gly Ser Gln Tyr Thr His Leu Ile Thr Arg Arg Ile Arg

20

25

30

agc cta tca att ttc tca ctc acc att aac ggc acc tct tcg tta gac 205

Ser Leu Ser Ile Phe Ser Leu Thr Ile Asn Gly Thr Ser Ser Leu Asp

35

40

45

tcc ata aaa gaa ctc gac cca cgt gtc att atc ctc tcg ggt gga ccc 253

Ser Ile Lys Glu Leu Asp Pro Arg Val Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro

50

55

60

cac agc gtc cac gct gac ggc gca ccg tgt ttc cca cct ggg ttc atc 301

His Ser Val His Ala Asp Gly Ala Pro Cys Phe Pro Pro Gly Phe Ile

65

70

75

gaa tac gtc gag tca cgt ggg att cac gtg ttg ggt ata tgt tat ggg 349



2



Lys	Glu	Arg	Glu	Arg	Val	Met	Glu	Leu	Phe	Glu	Lys	Arg	Leu	His	Leu		
			275					280					285				
cct	gtt	acc	tgt	gtc	gat	gct	aca	gaa	gaa	ttt	ctc	agc	aaa	cta	aaa	973	
Pro	Val	Thr	Cys	Val	Asp	Ala	Thr	Glu	Glu	Phe	Leu	Ser	Lys	Leu	Lys		
			290				295					300					
ggc	gta	aca	gaa	cct	gaa	atg	aag	agg	aaa	ata	att	ggg	aag	gag	ttc	1021	
Gly	Val	Thr	Glu	Pro	Glu	Met	Lys	Arg	Lys	Ile	Ile	Gly	Lys	Glu	Phe		
			305			310				315							
atc	aac	ata	ttt	gat	ctt	ttt	gcc	cat	gat	gtg	gag	gaa	aaa	gta	ggg	1069	
Ile	Asn	Ile	Phe	Asp	Leu	Phe	Ala	His	Asp	Val	Glu	Glu	Lys	Val	Gly		
320					325				330					335			
aaa	aaa	cct	agt	tac	cta	gtc	caa	gga	acc	ttg	tat	cct	gat	gta	ata	1117	
Lys	Lys	Pro	Ser	Tyr	Leu	Val	Gln	Gly	Thr	Leu	Tyr	Pro	Asp	Val	Ile		
				340				345						350			
gag	tct	tgt	cct	cca	cct	gga	agt	gga	aga	aca	cat	tct	cat	aca	atc	1165	
Glu	Ser	Cys	Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	Gly	Arg	Thr	His	Ser	His	Thr	Ile		
			355				360					365					
aag	agc	cat	cat	aat	gtt	gga	ggt	ctt	cca	aag	gac	atg	aag	ctg	aag	1213	
Lys	Ser	His	His	Asn	Val	Gly	Gly	Leu	Pro	Lys	Asp	Met	Lys	Leu	Lys		
			370			375					380						
ctc	atc	gag	cca	ctg	aaa	ctt	cta	ttc	aag	gat	gag	gtt	cgt	gaa	ttg	1261	
Leu	Ile	Glu	Pro	Leu	Lys	Leu	Leu	Phe	Lys	Asp	Glu	Val	Arg	Glu	Leu		
			385			390					395						
gga	aag	att	ttg	gat	ata	tct	gag	gac	ttt	ctt	aaa	cgc	cac	ccg	ttc	1309	
Gly	Lys	Ile	Leu	Asp	Ile	Ser	Glu	Asp	Phe	Leu	Lys	Arg	His	Pro	Phe		
400				405				410						415			
cct	ggg	ccc	gga	ctc	gct	gtg	cga	att	cca	ggt	gat	gtc	aca	gca	ggg	1357	
Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Ile	Pro	Gly	Asp	Val	Thr	Ala	Gly		
			420				425					430					
aat	tcc	ttg	gat	att	ctt	cgt	cag	gtt	gat	gaa	atc	ttc	att	caa	tca	1405	
Asn	Ser	Leu	Asp	Ile	Leu	Arg	Gln	Val	Asp	Glu	Ile	Phe	Ile	Gln	Ser		
			435				440					445					
atc	aga	gat	gct	aaa	atc	tat	gat	gaa	ata	tgg	caa	gct	ttt	gct	gtc	1453	
Ile	Arg	Asp	Ala	Lys	Ile	Tyr	Asp	Glu	Ile	Trp	Gln	Ala	Phe	Ala	Val		
			450			455					460						
ttc	tta	cca	gtg	aaa	act	gtt	gga	gta	caa	gga	gac	caa	aga	acc	cat	1501	



Phe Leu Pro Val Lys Thr Val Gly Val Gln Gly Asp Gln Arg Thr His  
 465 470 475  
  
 tcc cac gct gtt gca ctt aga gca gtc aca agt caa gat gga atg act 1549  
 Ser His Ala Val Ala Leu Arg Ala Val Thr Ser Gln Asp Gly Met Thr  
 480 485 490 495  
  
 gca gac tgg tac tac ttt gat ttc aag ttc ctt gac gac gta tca aga 1597  
 Ala Asp Trp Tyr Tyr Phe Asp Phe Lys Phe Leu Asp Asp Val Ser Arg  
 500 505 510  
  
 aag atc tgc aat agt gtt cgt ggt gta aat cga gtt ctg ctg gat att 1645  
 Lys Ile Cys Asn Ser Val Arg Gly Val Asn Arg Val Leu Leu Asp Ile  
 515 520 525  
  
 aca tca aag cct cca tca aca atc gaa tgg gaa taatttgta taaagaatgc 1698  
 Thr Ser Lys Pro Pro Ser Thr Ile Glu Trp Glu  
 530 535  
  
 tatatttggt gaccaaagta ggattctttt gtgatttttg gtgcataaca aaaaggaaga 1758  
  
 aaatcataat agaaatttag gtccttttgt tatgtggttag aactggttct tgggtaatta 1818  
  
 tgtgcaatgc tctcaacaat tttgtatggt tatgggtatg atgataccaa attttactca 1878  
  
 gatcttggtgta gtacattttt cttatccaag tatagtaaca tgtggccagg catcaaaagc 1938  
  
 ctattccact caaaaaaaaaa aaaaaaaaaac tcgag 1973

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 538

&lt;212&gt; PRT

<213> *Nicotiana tabacum*

&lt;400&gt; 2

Met Glu Pro Gln Thr Gln Ala Lys Lys Ser Asn Leu Val Leu Ile Leu  
 1 5 10 15  
  
 Asp Tyr Gly Ser Gln Tyr Thr His Leu Ile Thr Arg Arg Ile Arg Ser  
 20 25 30  
  
 Leu Ser Ile Phe Ser Leu Thr Ile Asn Gly Thr Ser Ser Leu Asp Ser  
 35 40 45  
  
 Ile Lys Glu Leu Asp Pro Arg Val Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro His  
 50 55 60



Ser Val His Ala Asp Gly Ala Pro Cys Phe Pro Pro Gly Phe Ile Glu  
 65 70 75 80  
 Tyr Val Glu Ser Arg Gly Ile His Val Leu Gly Ile Cys Tyr Gly Leu  
 85 90 95  
 Gln Leu Ile Val Gln Lys Leu Gly Gly Val Val Lys Ile Gly Glu Lys  
 100 105 110  
 His Glu Tyr Gly Arg Met Glu Ile Glu Val Gly Lys Asn Val Val Gly  
 115 120 125  
 Gly Leu Phe Gly Asn Thr Glu Ile Gly Asp Lys Gln Val Val Trp Met  
 130 135 140  
 Ser His Gly Asp Glu Ala Val Lys Leu Pro Glu Gly Phe Glu Val Val  
 145 150 155 160  
 Ala Arg Ser Ser Gln Gly Ala Val Ala Ala Ile Glu Asn Arg Glu Arg  
 165 170 175  
 Arg Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr His Pro Glu Val Thr His Ser Thr Glu  
 180 185 190  
 Gly Met Arg Thr Leu Arg His Phe Leu Phe Asp Val Cys Gly Val Thr  
 195 200 205  
 Ala Gly Trp Lys Met Glu Asp Val Leu Glu Glu Glu Ile Lys Val Ile  
 210 215 220  
 Lys Gly Met Val Gly Pro Glu Asp His Val Ile Cys Ala Leu Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Val Asp Ser Thr Val Ala Ala Lys Leu Val His Lys Ala Ile Gly  
 245 250 255  
 Asp Arg Leu His Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Tyr Lys  
 260 265 270  
 Glu Arg Glu Arg Val Met Glu Leu Phe Glu Lys Arg Leu His Leu Pro  
 275 280 285  
 Val Thr Cys Val Asp Ala Thr Glu Glu Phe Leu Ser Lys Leu Lys Gly  
 290 295 300  
 Val Thr Glu Pro Glu Met Lys Arg Lys Ile Ile Gly Lys Glu Phe Ile  
 305 310 315 320



Asn Ile Phe Asp Leu Phe Ala His Asp Val Glu Glu Lys Val Gly Lys  
 325 330 335  
 Lys Pro Ser Tyr Leu Val Gln Gly Thr Leu Tyr Pro Asp Val Ile Glu  
 340 345 350  
 Ser Cys Pro Pro Pro Gly Ser Gly Arg Thr His Ser His Thr Ile Lys  
 355 360 365  
 Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Asp Met Lys Leu Lys Leu  
 370 375 380  
 Ile Glu Pro Leu Lys Leu Leu Phe Lys Asp Glu Val Arg Glu Leu Gly  
 385 390 395 400  
 Lys Ile Leu Asp Ile Ser Glu Asp Phe Leu Lys Arg His Pro Phe Pro  
 405 410 415  
 Gly Pro Gly Leu Ala Val Arg Ile Pro Gly Asp Val Thr Ala Gly Asn  
 420 425 430  
 Ser Leu Asp Ile Leu Arg Gln Val Asp Glu Ile Phe Ile Gln Ser Ile  
 435 440 445  
 Arg Asp Ala Lys Ile Tyr Asp Glu Ile Trp Gln Ala Phe Ala Val Phe  
 450 455 460  
 Leu Pro Val Lys Thr Val Gly Val Gln Gly Asp Gln Arg Thr His Ser  
 465 470 475 480  
 His Ala Val Ala Leu Arg Ala Val Thr Ser Gln Asp Gly Met Thr Ala  
 485 490 495  
 Asp Trp Tyr Tyr Phe Asp Phe Lys Phe Leu Asp Asp Val Ser Arg Lys  
 500 505 510  
 Ile Cys Asn Ser Val Arg Gly Val Asn Arg Val Leu Leu Asp Ile Thr  
 515 520 525  
 Ser Lys Pro Pro Ser Thr Ile Glu Trp Glu  
 530 535

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1232

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Physcomitrella patens



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (3)..(1148)

&lt;400&gt; 3

```

ga att cgg cac gag gcc act agt acg cag ggt aat att gcc gct att      47
  Ile Arg His Glu Ala Thr Ser Thr Gln Gly Asn Ile Ala Ala Ile
    1             5             10             15

gaa aat gtg gat tcc aga atc tac gcc ctc caa tac cat ccc gag gtt      95
  Glu Asn Val Asp Ser Arg Ile Tyr Ala Leu Gln Tyr His Pro Glu Val
                20             25             30

acg cac tca gag aaa ggg aca gag act ttg aga cac ttt ttc ctg aat      143
  Thr His Ser Glu Lys Gly Thr Glu Thr Leu Arg His Phe Phe Leu Asn
                35             40             45

gtc tgc ggc atg aag gct gac tgg cag atg cag aat gtg ttg gag gaa      191
  Val Cys Gly Met Lys Ala Asp Trp Gln Met Gln Asn Val Leu Glu Glu
                50             55             60

gag att aaa aag gtc act gcg acc gtc ggc cca gat gat cat gtt att      239
  Glu Ile Lys Lys Val Thr Ala Thr Val Gly Pro Asp Asp His Val Ile
                65             70             75

tgt gca ctc tcc ggg ggc gtg gac tca aca gta gca gct act ctg gtg      287
  Cys Ala Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Thr Val Ala Ala Thr Leu Val
                80             85             90             95

cac cgt gct att gga gat cgc ctt cat tgt gtg ttt gta gat aat ggc      335
  His Arg Ala Ile Gly Asp Arg Leu His Cys Val Phe Val Asp Asn Gly
                100             105             110

ctt tgc aga tac aag gaa aga gaa aga gtg atg gcc aca ttt gtg aaa      383
  Leu Cys Arg Tyr Lys Glu Arg Glu Arg Val Met Ala Thr Phe Val Lys
                115             120             125

gac ctt cat ctg cca gtc act tgt gtg gat gcc act gag cag ttt ctc      431
  Asp Leu His Leu Pro Val Thr Cys Val Asp Ala Thr Glu Gln Phe Leu
                130             135             140

agc aaa ttg aag ggc gtg gta gat cca gag aga aag agg aag atc atc      479
  Ser Lys Leu Lys Gly Val Val Asp Pro Glu Arg Lys Arg Lys Ile Ile
                145             150             155

gga gca gag ttt att gca gtc ttt gat gaa ttt tcg cac aga ttg gag      527
  Gly Ala Glu Phe Ile Ala Val Phe Asp Glu Phe Ser His Arg Leu Glu
                160             165             170             175

```



```

aga gag att gga aag atg cct gct ttc ctt gtg cag gga aca ctt tat 575
Arg Glu Ile Gly Lys Met Pro Ala Phe Leu Val Gln Gly Thr Leu Tyr
          180                      185                      190

cca gat gtc att gag tcg tgt cct cct cca ggg agc ggg aag tcg cat 623
Pro Asp Val Ile Glu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Ser Gly Lys Ser His
          195                      200                      205

tcc cac aca atc aaa agt cat cac aac gtc ggt ggc ttg ccc gag aac 671
Ser His Thr Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Glu Asn
          210                      215                      220

atg aaa ttg aag ttg gtt gag cct ctc aag tgg ctc ttc aaa gac gag 719
Met Lys Leu Lys Leu Val Glu Pro Leu Lys Trp Leu Phe Lys Asp Glu
          225                      230                      235

gta cgc gaa atg ggt gca ttg ttg gat gta cct gtt tcc ttt ttg aag 767
Val Arg Glu Met Gly Ala Leu Leu Asp Val Pro Val Ser Phe Leu Lys
          240                      245                      250                      255

cgc cat cct ttc cct gga cct gga ttg gcc gtg cga att ctt ggg gat 815
Arg His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Ala Val Arg Ile Leu Gly Asp
          260                      265                      270

gta act cag gac ggc gca ctc gac act atc cgc ttg gtt gat gag atc 863
Val Thr Gln Asp Gly Ala Leu Asp Thr Ile Arg Leu Val Asp Glu Ile
          275                      280                      285

ttt gtg aac agc att cga gag gca ggt ctt tac gat aag atc tgg cag 911
Phe Val Asn Ser Ile Arg Glu Ala Gly Leu Tyr Asp Lys Ile Trp Gln
          290                      295                      300

gca ttt gct gtt tat ctg cca gta aag act gtt ggc gtt caa ggc gac 959
Ala Phe Ala Val Tyr Leu Pro Val Lys Thr Val Gly Val Gln Gly Asp
          305                      310                      315

aaa cgg aca cat tca cac gct gtt gct cta cgt gca att aca agt gaa 1007
Lys Arg Thr His Ser His Ala Val Ala Leu Arg Ala Ile Thr Ser Glu
          320                      325                      330                      335

gac gga atg act gct gac tgg ttt cat ttt gat gga aag ttt ctt gcc 1055
Asp Gly Met Thr Ala Asp Trp Phe His Phe Asp Gly Lys Phe Leu Ala
          340                      345                      350

gag gta tca tct aaa atc tgc aac agc gta agg ggt atc aat agg gtg 1103
Glu Val Ser Ser Lys Ile Cys Asn Ser Val Arg Gly Ile Asn Arg Val
          355                      360                      365

```



gta tac gac att acg tct aaa cct cca tca act gtt gag tgg gaa 1148  
 Val Tyr Asp Ile Thr Ser Lys Pro Pro Ser Thr Val Glu Trp Glu  
 370 375 380

tagacgtcag taatgtatatt tggaagtact gttgggttatg acgattcact gcaataactta 1208

acaaactatt ttataacttca aaaa 1232

<210> 4

<211> 382

<212> PRT

<213> Physcomitrella patens

<400> 4

Ile Arg His Glu Ala Thr Ser Thr Gln Gly Asn Ile Ala Ala Ile Glu  
 1 5 10 15

Asn Val Asp Ser Arg Ile Tyr Ala Leu Gln Tyr His Pro Glu Val Thr  
 20 25 30

His Ser Glu Lys Gly Thr Glu Thr Leu Arg His Phe Phe Leu Asn Val  
 35 40 45

Cys Gly Met Lys Ala Asp Trp Gln Met Gln Asn Val Leu Glu Glu Glu  
 50 55 60

Ile Lys Lys Val Thr Ala Thr Val Gly Pro Asp Asp His Val Ile Cys  
 65 70 75 80

Ala Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Thr Val Ala Ala Thr Leu Val His  
 85 90 95

Arg Ala Ile Gly Asp Arg Leu His Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu  
 100 105 110

Cys Arg Tyr Lys Glu Arg Glu Arg Val Met Ala Thr Phe Val Lys Asp  
 115 120 125

Leu His Leu Pro Val Thr Cys Val Asp Ala Thr Glu Gln Phe Leu Ser  
 130 135 140

Lys Leu Lys Gly Val Val Asp Pro Glu Arg Lys Arg Lys Ile Ile Gly  
 145 150 155 160

Ala Glu Phe Ile Ala Val Phe Asp Glu Phe Ser His Arg Leu Glu Arg  
 165 170 175



6

7

8

9

Glu Ile Gly Lys Met Pro Ala Phe Leu Val Gln Gly Thr Leu Tyr Pro  
 180 185 190

Asp Val Ile Glu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Ser Gly Lys Ser His Ser  
 195 200 205

His Thr Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Glu Asn Met  
 210 215 220

Lys Leu Lys Leu Val Glu Pro Leu Lys Trp Leu Phe Lys Asp Glu Val  
 225 230 235 240

Arg Glu Met Gly Ala Leu Leu Asp Val Pro Val Ser Phe Leu Lys Arg  
 245 250 255

His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Ala Val Arg Ile Leu Gly Asp Val  
 260 265 270

Thr Gln Asp Gly Ala Leu Asp Thr Ile Arg Leu Val Asp Glu Ile Phe  
 275 280 285

Val Asn Ser Ile Arg Glu Ala Gly Leu Tyr Asp Lys Ile Trp Gln Ala  
 290 295 300

Phe Ala Val Tyr Leu Pro Val Lys Thr Val Gly Val Gln Gly Asp Lys  
 305 310 315 320

Arg Thr His Ser His Ala Val Ala Leu Arg Ala Ile Thr Ser Glu Asp  
 325 330 335

Gly Met Thr Ala Asp Trp Phe His Phe Asp Gly Lys Phe Leu Ala Glu  
 340 345 350

Val Ser Ser Lys Ile Cys Asn Ser Val Arg Gly Ile Asn Arg Val Val  
 355 360 365

Tyr Asp Ile Thr Ser Lys Pro Pro Ser Thr Val Glu Trp Glu  
 370 375 380



1  
2  
3  
4

1  
2  
3  
4

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
12. April 2001 (12.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/25457 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82, 9/00, 15/52, G01N 33/53

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09245

(22) Internationales Anmeldedatum:  
21. September 2000 (21.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 47 490.7 1. Oktober 1999 (01.10.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, 68526 Ladenburg (DE). EHRHARDT, Thomas [DE/DE]; Maulbronner Hof 49, 67346 Speyer (DE). SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). BOLDT, Ralf [DE/DE]; Stieg 19, 06484 Quedlinburg (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

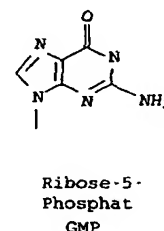
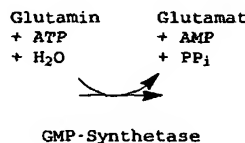
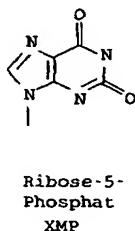
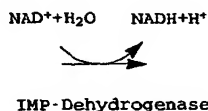
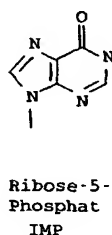
Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 20. Dezember 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: GMP SYNTHETASE DERIVED FROM PLANTS

(54) Bezeichnung: GMP-SYNTHETASE AUS PFLANZEN



(57) Abstract: The invention relates to a DNA that encodes a polypeptide that has GMP synthetase (EC 6.3.5.2) activity. The invention further relates to the use of said nucleic acid in the production of a test system.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine DNA codierend für ein Polypeptid mit GMP-Synthetase (EC 6.3.5.2) Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Nukleinsäure zur Herstellung eines Testsystems.

WO 01/25457 A3

•

↓

•

↓

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.

PCT/EP 00/09245

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12N9/00 C12N15/52 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBL, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: F14426, 20 July 1995 (1995-07-20) MORRIS, P.C., ET AL.: "A. thaliana transcribed sequence; clone YAY969; 3' end; similar to GMP Synthase; Saccharomyces cerevisiae." XP002167639 the whole document	2
X	DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: AW041228, 17 September 1999 (1999-09-17) D'ASCENZO M., ET AL.: "EST284092 tomato mixed elicitor, BTI Lycopersicon esculentum cDNA clone" XP002167640 the whole document	2

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 June 2001

Date of mailing of the international search report

28. 06. 01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 00/09245

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 927 761 A (BASF AG) 7 July 1999 (1999-07-07)	2
A	SEQ ID NOS:10 and 11	1,3-12
P,X	--- DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: AC011622, 11 October 1999 (1999-10-11) LIN, X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC F2407 genomic sequence, complete sequence." XP002167641 /product="GMP synthase; 61700-64653"	2
P,X	--- DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: AW127061, 24 October 1999 (1999-10-24) QUATRANO, R., ET AL.: " ga20f03.y1 Moss EST library PPU Physcomitrella patens cDNA clone PEP SOURCE ID:PPU021506 5' similar to TR:066601 066601 GMP SYNTHASE. ;,mRNA sequence." XP002167642 the whole document	2
A	--- US 5 780 254 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14 July 1998 (1998-07-14) the whole document	1-12
A	--- US 5 780 253 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14 July 1998 (1998-07-14) the whole document	1-12
A	--- WO 95 27789 A (SYNTEX INC) 19 October 1995 (1995-10-19) the whole document	1-12
A	--- WO 98 10074 A (BASF AG ;LERCHL JENS (DE); SONNEWALD UWE (DE); BADUR RALF (DE); SC) 12 March 1998 (1998-03-12) the whole document	1-12,16
A	--- WO 99 27119 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ;NOVARTIS AG (CH); GUYER CHARLES DAVI) 3 June 1999 (1999-06-03) the whole document	1-12,16
A	--- WO 96 19576 A (CIBA GEIGY AG) 27 June 1996 (1996-06-27) the whole document -----	1-12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP00/09245

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

13-15

2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see additional sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of box I.2

Claims Nos.: 13-15

Present patent claims 13-15 relate to a product/a compound that is defined by a desirable peculiarity or property, namely GMP synthetase inhibitors. The patent claims therefore comprise all products etc. that have this peculiarity or property, while only a limited portion of such products etc. are supported in the description according to the terms of Article 5 PCT. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible. Regardless of the above, the patent claims also lack clarity under Art. 6 PCT, since they try to define the product/method/compound by referring to the desired result. This lack of clarity is so grave that it makes a meaningful search covering the entire scope of protection impossible. Therefore, no search was carried out.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/09245

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0927761 A	07-07-1999	CN 1227870 A CN 1283229 T WO 9933993 A EP 1040193 A JP 11243975 A	08-09-1999 07-02-2001 08-07-1999 04-10-2000 14-09-1999
US 5780254 A	14-07-1998	NONE	
US 5780253 A	14-07-1998	NONE	
WO 9527789 A	19-10-1995	US 5965350 A AU 2233095 A US 5789216 A US 5998186 A	12-10-1999 30-10-1995 04-08-1998 07-12-1999
WO 9810074 A	12-03-1998	AU 4553097 A BR 9711658 A EP 0927246 A JP 2001500008 T	26-03-1998 24-08-1999 07-07-1999 09-01-2001
WO 9927119 A	03-06-1999	AU 1963999 A BR 9815035 A CN 1280623 T EP 1034284 A ZA 9810771 A	15-06-1999 03-10-2000 17-01-2001 13-09-2000 26-05-1999
WO 9619576 A	27-06-1996	US 5519125 A US 5688939 A AU 697094 B AU 4342896 A CA 2207024 A EP 0813599 A FI 972549 A JP 10510714 T US 5882869 A	21-05-1996 18-11-1997 24-09-1998 10-07-1996 27-06-1996 29-12-1997 18-06-1997 20-10-1998 16-03-1999



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09245

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 C12N15/82 C12N9/00 C12N15/52 G01N33/53		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, EMBL, WPI Data		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: F14426, 20. Juli 1995 (1995-07-20) MORRIS, P.C., ET AL.: "A. thaliana transcribed sequence; clone YAY969; 3' end; similar to GMP Synthase; Saccharomyces cerevisiae." XP002167639 das ganze Dokument	2
X	DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: AW041228, 17. September 1999 (1999-09-17) D'ASCENZO M., ET AL.: "EST284092 tomato mixed elicitor, BTI Lycopersicon esculentum cDNA clone" XP002167640 das ganze Dokument	2
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 22. Juni 2001		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 28. 06. 01
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Maddox, A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09245

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 927 761 A (BASF AG) 7. Juli 1999 (1999-07-07)	2
A	SEQ ID NOS:10 und 11	1,3-12
P,X	--- DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: AC011622, 11. Oktober 1999 (1999-10-11) LIN, X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC F24D7 genomic sequence, complete sequence." XP002167641 /product="GMP synthase; 61700-64653"	2
P,X	--- DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: AW127061, 24. Oktober 1999 (1999-10-24) QUATRANO, R., ET AL.: " ga20f03.y1 Moss EST library PPU Physcomitrella patens cDNA clone PEP SOURCE ID:PPU021506 5' similar to TR:066601 066601 GMP SYNTHASE. ;,mRNA sequence." XP002167642 das ganze Dokument	2
A	--- US 5 780 254 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14) das ganze Dokument	1-12
A	--- US 5 780 253 A (SUBRAMANIAN VENKITESWARAN ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14) das ganze Dokument	1-12
A	--- WO 95 27789 A (SYNTEX INC) 19. Oktober 1995 (1995-10-19) das ganze Dokument	1-12
A	--- WO 98 10074 A (BASF AG ;LERCHL JENS (DE); SONNEWALD UWE (DE); BADUR RALF (DE); SC) 12. März 1998 (1998-03-12) das ganze Dokument	1-12,16
A	--- WO 99 27119 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ;NOVARTIS AG (CH); GUYER CHARLES DAVI) 3. Juni 1999 (1999-06-03) das ganze Dokument	1-12,16
A	--- WO 96 19576 A (CIBA GEIGY AG) 27. Juni 1996 (1996-06-27) das ganze Dokument -----	1-12

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/09245

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☒ Ansprüche Nr. **13-15**   
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich   
 **siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
  
3. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld 1.2

Ansprüche Nr.: 13-15

Die geltenden Patentansprüche 13-15 beziehen sich auf ein Produkt/eine Verbindung/, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich GMP synthetase Inhibitoren. Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT für keinen solchen Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt/Verfahren/die Verbindung über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde keine Recherche durchgeführt

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09245

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0927761 A	07-07-1999	CN 1227870 A	08-09-1999
		CN 1283229 T	07-02-2001
		WO 9933993 A	08-07-1999
		EP 1040193 A	04-10-2000
		JP 11243975 A	14-09-1999
US 5780254 A	14-07-1998	KEINE	
US 5780253 A	14-07-1998	KEINE	
WO 9527789 A	19-10-1995	US 5965350 A	12-10-1999
		AU 2233095 A	30-10-1995
		US 5789216 A	04-08-1998
		US 5998186 A	07-12-1999
WO 9810074 A	12-03-1998	AU 4553097 A	26-03-1998
		BR 9711658 A	24-08-1999
		EP 0927246 A	07-07-1999
		JP 2001500008 T	09-01-2001
WO 9927119 A	03-06-1999	AU 1963999 A	15-06-1999
		BR 9815035 A	03-10-2000
		CN 1280623 T	17-01-2001
		EP 1034284 A	13-09-2000
		ZA 9810771 A	26-05-1999
WO 9619576 A	27-06-1996	US 5519125 A	21-05-1996
		US 5688939 A	18-11-1997
		AU 697094 B	24-09-1998
		AU 4342896 A	10-07-1996
		CA 2207024 A	27-06-1996
		EP 0813599 A	29-12-1997
		FI 972549 A	18-06-1997
		JP 10510714 T	20-10-1998
		US 5882869 A	16-03-1999



WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 13-15

Die geltenden Patentansprüche 13-15 beziehen sich auf ein Produkt/eine Verbindung/, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich GMP synthetase Inhibitoren. Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT für keinen solchen Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt/Verfahren/die Verbindung über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde keine Recherche durchgeführt

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.



REPLACED BY  
ART 34 AMDT

We claim:

- 5 1. A DNA sequence comprising the coding region of a plant GMP synthetase, wherein this DNA sequence has the nucleotide sequence SEQ-ID No: 1 or SEQ-ID No: 3.
- 10 2. A DNA sequence which hybridizes with the DNA sequence SEQ-ID No: 1 or SEQ-ID No: 3 as claimed in claim 1 or parts thereof or derivatives derived from these sequences by insertion, deletion or substitution, and codes for a protein which has the biological activity of a GMP synthetase.
- 15 3. A protein having GMP synthetase activity and comprising an amino acid sequence which represents a portion of at least 100 amino acids of the sequence SEQ-ID No: 2 or 4.
- 20 4. A protein as claimed in claim 3, which comprises as amino acid sequence the part-sequence 50 - 300 from SEQ-ID No: 2 or SEQ-ID No: 4.
- 25 5. A protein as claimed in claim 4, which comprises as amino acid sequence the sequence depicted in SEQ-ID No: 2 or SEQ-ID No: 4.
- 30 6. The use of a DNA sequence as claimed in claim 1 or 2 for introduction into pro- or eukaryotic cells, this sequence optionally being linked to control elements which ensure transcription and translation in the cells, and leading to expression of a translatable mRNA which brings about the synthesis of a plant GMP synthetase.
- 35 7. The use of a DNA sequence as claimed in claim 1 or 2 for producing an assay system for identifying inhibitors of plant GMP synthetase with a herbicidal action.
- 40 8. A method for finding substances which inhibit the activity of plant GMP synthetase, which comprises in a first step using a DNA sequence as claimed in claim 1 or 2 preparing GMP synthetase, and in a second step measuring the activity of the plant GMP synthetase in the presence of a test substance.
- 45 9. A method as claimed in claim 8, wherein the measurement of the plant GMP synthetase is carried out in a high throughput



screening (HTS).

10. A method for identifying substances with a herbicidal action,  
which inhibit the GMP synthetase activity in plants,  
consisting of
- a) preparation of transgenic plants, plant tissues, or plant cells which comprise an additional DNA sequence coding for an enzyme having GMP synthetase activity and are able to overexpress an enzymatically active GMP synthetase;
  - b) application of a substance to transgenic plants, plant cells, plant tissues or plant parts and to untransformed plants, plant cells, plant tissues or plant parts;
  - c) determination of the growth or survivability of the transgenic and untransformed plants, plant cells, plant tissues or plant parts after application of the chemical substance; and
  - d) comparison of the growth or survivability of the transgenic and untransformed plants, plant cells, plant tissues or plant parts after application of the chemical substance;
- where suppression of the growth or survivability of the untransformed plants, plant cells, plant tissues or plant parts without, however, greatly suppressing the growth or the survivability of the transgenic plants, plant cells, plant tissues or plant parts demonstrates that the substance from b) shows herbicidal activity and inhibits the enzymic activity in plants.
11. An assay system based on the expression of a DNA sequence SEQ-ID No. 1 or SEQ-ID No. 3 as claimed in claim 1 or 2 for identifying inhibitors of plant GMP synthetase with a herbicidal action.
12. An assay system as claimed in claim 11 for identifying inhibitors of plant GMP synthetase, wherein the enzyme is incubated with a test substrate to be investigated and, after a suitable reaction time, the enzymatic activity of the enzyme is measured by comparison with the activity of the uninhibited enzyme.



27

13. An inhibitor of plant GMP synthetase.

14. An inhibitor of plant GMP synthetase identified using an assay system as claimed in claim 11 or 12.

5

15. An inhibitor as claimed in either of claims 13 or 14 for use as herbicide.

10 16. A method for eliminating unwanted plant growth, which comprises treating the plants to be eliminated with a compound which specifically binds to GMP synthetase encoded by a DNA sequence as claimed in claim 1 or 2, and inhibits the function thereof.

15

20

25

30

35

40

45

